

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

**ANÁLISE FILOGENÉTICA POR PINTURA CROMOSSÔMICA MULTICOLOR,
EM ROEDORES DA TRIBO AKODONTINI (RODENTIA, CRICETIDAE),
OCORRENTES NA REGIÃO SUL DO BRASIL.**

**CURITIBA
2006**

IRIS HASS

**ANÁLISE FILOGENÉTICA POR PINTURA CROMOSSÔMICA MULTICOLOR,
EM ROEDORES DA TRIBO AKODONTINI (RODENTIA, CRICETIDAE),
OCORRENTES NA REGIÃO SUL DO BRASIL.**

Tese de Doutorado apresentado à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Genética da UFPR.

Orientador: Prof. Dr. Ives José Sbalqueiro
(UFPR) e Co-orientador: Dr. Stefan Müller
(LMU).

CURITIBA
2006

Universidade Federal do Paraná***Sistema de Bibliotecas***

Hass, Iris

Análise filogenética por pintura cromossômica multicolor, em roedores da tribo Akodontini (Rodentia, Cricetidae), ocorrentes na região sul do Brasil. / Iris Hass. – Curitiba, 2006.

xix; 166f. : 45il. ; 30cm.

Orientador: Ives José Sbalqueiro

Co-orientador: Stefan Müller

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Citogenética molecular 2. Cromossomos 3. Cricetidae I. Título II. Sbalqueiro, Ives José, 1947- III. Müller, Stefan IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.

CDD(20.ed.) 575.1

Dedico esta Tese de Doutorado aos meus pais, Avelino e Ivanilde, a minha tia, Ivonete, e aos meus irmãos, Ricardo e Charles, pelo apoio e compreensão durante todos estes anos. Ao meu querido e amado Michael, um especial obrigada.

Obrigada a todos!

Dizem que sou louca

Por pensar assim

Se sou muito louca

Por eu ser feliz

Mais louco é quem me diz

E não é feliz, não é feliz.....

Sim, sou muito louca

Não vou me curar

Já não sou a única

Que encontrou a paz

Mais louco é quem me diz

E não é feliz

Eu sou feliz!

Balada do louco

Rita Lee e Arnaldo Baptista

AGRADECIMENTOS

Meu interesse pela Genética começou ainda no colégio, e a oportunidade de maior contato com este ramo da Biologia, deu-se com um breve estágio voluntário, e logo em seguida como bolsista de Iniciação Científica, no Laboratório de Citogenética Animal da UFPR, sob a orientação do Prof. Dr. Ives José Sbalqueiro. Isto não teria ocorrido se não fosse o incentivo da minha querida amiga Deborah Alfonso Cornélio.

Como este trabalho baseou-se em amostras de lugares distantes e necessitou da utilização de muitos equipamentos, a pesquisa aqui apresentada só foi possível graças à colaboração de muitas pessoas. Dentre elas, gostaria de agradecer ao Professor Sérgio Luiz Althoff (FURB) que cedeu amostras de tecido de medula óssea fixada, de alguns exemplares, que fazem parte da amostra aqui trabalhada. Gostaria de agradecer também aos professores e funcionários do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, em especial a oportunidade de utilização do Fotomicroscópio de Fluorescência do Setor de Ciências Biológicas.

Também registro aqui o meu grande carinho aos atuais companheiros e aos companheiros do passado, do Laboratório de Citogenética Animal, que de certa forma contribuíram para a realização e finalização do meu trabalho, que me apoiaram e vibraram a cada etapa vencida.

A arte final desta tese só foi possível graças ao talento e grande paciência do meu irmão Ricardo Hass.

Agradeço também todos os colegas da LMU, em Munique, pelo agradável tempo que passei na Alemanha, e em especial aos companheiros de laboratório

Michaela, Christian, Dani e Radka. Agradeço também ao Chefe do Laboratório de Genética Humana Prof. Dr. Thomas Cremer, e seus professores assistentes: Dra. Marion Cremer, Dra. Irina Solovei e Dr. Steffen Ditzel.

Agradeço a Comissão de Acompanhamento da tese, formada pelos: Prof. Dr. José Fernando de Souza Lima e Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correia de Oliveira, que sempre propuseram correções construtivas.

Agradeço também os Membros da Banca da Defesa de Tese: Profa. Dra. Enilze Maria Fonseca Ribeiro, Prof. Dr. Thales Renato O. de Freitas, Prof. Dr. Fernando de Camargo Passos e Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correia de Oliveira, suplentes: Prof. Dr. José Fernando de Souza Lima e Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, obrigada pelas sugestões apresentadas.

O meu especial agradecimento aos professores que me orientaram neste trabalho. Ao meu orientador, Prof. Dr. Ives José Sbalqueiro, por sua instrução, apoio, amizade, sugestões e discussões nestes vários anos de convívio, tenha certeza que esta tese de doutorado não se realizaria sem a sua importantíssima colaboração. Ao meu co-orientador, Dr. Stefan Müller, a quem também agradeço pelo grande apoio, amizade e confiança depositados, obrigada pela sua fundamental participação na elaboração e finalização desta Tese.

As minhas amigas inseparáveis: Thatyana Carla Ciasca Santos (Thaty), Rosângela de Fátima Ieger Reitz (Rô) e Marta Margarete Cestari (Marga), por me apoiarem nos difíceis momentos, me incentivarem sempre, e compartilharem alegrias e tristezas. Saibam que não tenho palavras para agradecer!

Não poço esquecer da minha nova família brasileira, que só descobri que existia quando estive por mais de dois anos na Alemanha. Aos meus queridos e

importantíssimos amigos: Tati, Elaine, Evelize, Jorge, Gustavo e Zé, o meu MUITO OBRIGADA pelo apoio, companheirismo, amizade, e força para superar os momentos difíceis. Sei que sempre poderei contar com vocês.

Agradeço, novamente, aos meus pais, minha tia e meus irmãos, que foram fundamentais para a conclusão desta tese.

Um especial agradecimento ao meu Michael Menzner, que com sua enorme paciência, compreensão e amor, conseguiu me ajudar para que esta tese de doutorado fosse concretizada, principalmente em dois momentos fundamentais: durante a realização da parte prática na Alemanha, que foi muito laboriosa e exigiu muita persistência; e quando da sua finalização, não menos complexa e fatigante que a anterior, aqui no Brasil.

E finalmente, aos meus inúmeros amigos e familiares, que me encorajaram.

Sei que cada um de vocês, aqui mencionados, possui um talento em especial e foram estes talentos que me ajudaram todo este tempo.

Peço desculpas se deixei de agradecer alguém, mas se você foi e é importante, tenha certeza que não te esqueci, apenas deixei de mencionar seu nome nesta lista.

Mais uma vez, muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xvi
Lista de Abreviaturas	xvii
Resumo	xviii
Abstract	xix
I. INTRODUÇÃO	1
1. ORDEM RODENTIA	1
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2. HISTÓRICO PALEONTOLÓGICO DOS ROEDORES E DA FAMÍLIA CRICETIDAE NA AMÉRICA DO SUL	7
1.3. CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIA DA FAMÍLIA CRICETIDAE NA AMÉRICA DO SUL	10
1.4. A TRIBO AKODONTINI	12
1.4.1. O GÊNERO <i>Akodon</i>	13
1.4.2. O GÊNERO <i>Brucepattersonius</i>	14
1.4.3. O GÊNERO <i>Necromys</i>	15
1.4.4. O GÊNERO <i>Oxymycterus</i>	17
1.4.5. O GÊNERO <i>Thaptomys</i>	18
2. ALTERAÇÃO NA ESTRUTURA E NÚMERO DE CROMOSSOMOS	19
2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
2.2. AS PRINCIPAIS ALTERAÇÕES NA ESTRUTURA DOS CROMOSSOMOS DE ROEDORES E SUAS IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS	21
Inversões	21
Translocações	23
3. VARIAÇÕES CARIOTÍPICAS E SEU AUXÍLIO NA TAXONOMIA	25
4. CITOGÉNÉTICA MOLECULAR	26
4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	26
4.2. UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE FISH EM ESTUDOS EVOLUTIVOS E FILOGENÉTICOS	28
4.3. ESTUDO DA SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA	29

5. OBJETIVOS	33
II. MATERIAIS E MÉTODOS	34
1. MATERIAIS	34
1.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	34
2. MÉTODOS	35
2.1. MÉTODOS CITOGENÉTICOS	35
2.1.1. Preparação mitótica	35
2.1.2. Preparação da lâmina	36
2.1.3. Bandeamento G	36
3. HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i>	36
3.2. HIBRIDAÇÃO ESPÉCIE-ESPECÍFICA DOS EXEMPLARES DE AKODONTINOS	37
3.2.1. Preparação de sondas genômicas de DNA (GISH) para testar a qualidade das metáfases (DNA) da amostra	37
3.2.2. Verificação dos fragmentos produzidos na DOP-PCR	39
3.2.3. Preparação das sondas de DNA espécie-específicas marcadas com fluorocromos.....	39
3.2.4. Preparação das sondas para hibridação	40
3.2.5. Montagem das lâminas para hibridação	41
3.2.6. Desnaturação das sondas de DNA marcadas	42
3.2.7. Preparação das lâminas montadas para a hibridação	42
3.2.8. Hibridação	42
3.2.9. Lavagens pós-hibridação	43
3.2.10. Detecção dos sinais de hibridação	43
3.2.11. Coloração com Actinomicina D/DAPI	44
3.3. Hibridação com as sondas cromossomo-específicas de <i>Mus musculus</i>	45
3.3.1. Preparação das Sondas de DNA cromossomo-específicas	47

3.3.2. Marcação por amplificação dos fragmentos de cromossomos – DOP-PCR....	48
3.3.3. Preparação dos SETs para hibridação	49
3.3.4. Montagem das lâminas para hibridação	50
3.3.5. Denaturação das sondas de DNA marcadas	50
3.3.6. Preparação das lâminas montadas para a hibridação	50
3.3.7. Hibridação	50
3.3.8. Lavagens pós-hibridação	51
3.3.9. Detecção dos sinais de hibridação	51
3.3.10. Coloração com Actinomicina D/DAPI	52
3.3.11. Hibridação sequencial	52
3.4. Análises	53
3.4.1. Ao microscópio	53
3.4.2. Captura de imagens e documentação	53
4. RECONSTRUÇÃO DO CARIÓTIPO ANCESTRAL DOS ROEDORES	54
5. ESTUDO CLADÍSTICO	54
5. 1. Métodos cladísticos numéricos	54
5. 2. Polarização	56
5. 3. Análise das hibridações	57
III. RESULTADOS	59
1. Cariótipos em Banda G	59
2. OBTENÇÃO DE SONDAS ESPÉCIE-ESPECÍFICAS	59
3. HIBRIDAÇÕES COM SONDAS CROMOSSOMO-ESPECÍFICAS DE <i>Mus musculus</i>	61
3. 1. Hibridação entre <i>Mus musculus</i> , 2n = 40, e <i>A. cursor</i> , 2n = 14, 15 e 16	61
3. 2. Hibridação entre <i>Mus musculus</i> , 2n = 40 e <i>A. montensis</i> , 2n = 24	67
3. 3. Hibridação entre <i>Mus musculus</i> , 2n = 40, e <i>A. paranaensis</i> , 2n = 44	74
3. 4. Hibridação entre <i>Mus musculus</i> , 2n = 40, e <i>A. serrensis</i> , 2n = 46	80

3. 5. Hibridação entre <i>Mus musculus</i> , $2n = 40$, e <i>Thaptomys nigrita</i> (TNI), $2n = 52$	86
3.6. Hibridação entre <i>Mus musculus</i> , $2n = 40$, e <i>Necromys lasiurus</i> , $2n = 34$	92
3.7. Hibridação entre <i>Mus musculus</i> , $2n = 40$, e <i>Brucepattersonius griserufenscens</i> , $2n = 52$	98
3.8. Hibridação entre <i>Mus musculus</i> , $2n = 40$, e <i>Oxymycterus</i> sp., $2n = 54$	104
4. CARIÓTIPO ANCESTRAL DOS ROEDORES	110
4. 1. Comparações entre os dados de akodontinos e o mapa cromossômico de MMU identificados com os respectivos cromossomos de <i>Homo sapiens</i> (HSA)	110
4. 2. Contribuição ao modelo cariotípico do Roedor Ancestral	111
5. Relações Filogenéticas entre os Akodontinos	114
5. 1. Utilização de MMU como grupo externo	114
5. 2. Utilização de CGR como grupo externo	114
6. Relações Filogenéticas entre os akodontinos e roedores do Velho Mundo	118
6. 1. Utilização de MMU como grupo externo	118
6. 2. Utilização de CGR como grupo externo	121
IV. DISCUSSÃO	122
1. Utilização de ZOO-FISH para a detecção de homeologias cromossômicas em roedores	122
2. Estudos filogenéticos em roedores da tribo akodontini através da análise cromossômica com emprego de bandejamento G e FISH	124
3. Importância das associações sintênicas na ancestralidade cariotípica	128
4. Filogenia dos roedores por meio da citogenética molecular	132
V. CONCLUSÃO	137
REFERÊNCIAS	140
ANEXOS	162

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Exemplares de Akodontinos após captura em armadilha “life trap”, de arame galvanizado.....34
- Figura 2 – Modelo de comparação cariotípica entre MMU e HSA: a) cromossomo extraído de bancos de dados; b) ideograma do cromossomo de MMU com os respectivos segmentos cromossômicos de HSA assinalados no lado direito.....55
- Figura 3 - Foto das metáfases com hibridação espécie-específica: a) e b) AMO; c) e d) APA; e) e f) BRU; g) e h) TNI. As fotos: a), c), e) e g) são as metáfases com contra coloração de Actinomicina D/DAPI. As fotos: b), d), f) e h) são as respectivas metáfases com sondas em coloração vermelha (biotina-Cy5) e em azul DAPI, mostrando forte marcação em vermelho das regiões heterocromáticas.....61
- Figura 4 – a) a r): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo-específicas de MMU em metáfases de *Akodon cursor*, $2n = 14, 15$ e 16 . a) marcações em azul do cromossomo 1, em verde do cromossomo 2 e em vermelho do cromossomo 3; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em azul do cromossomo 4, em verde do cromossomo 5 e em vermelho do cromossomo 6; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em azul do cromossomo 7, em verde do cromossomo 8 e em vermelho do cromossomo 9; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;.....63
- Figura 5 – Cariótipo em banda G (conforme SBALQUEIRO; NASCIMENTO, 1996) de *Akodon cursor*, $2n = 15$, onde os cromossomos estão numerados abaixo. A hibridação com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita. O asterisco denota regiões não hibridadas.....66
- Figura 6 – a) a w): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Akodon montensis*, $2n = 24$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 5 e em verde do cromossomo 6; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;.....68

Figura 7 – Cariótipo em banda G de *Akodon montensis*, $2n = 24$, onde o número de cada cromossomo está colocado abaixo do mesmo, conforme SBALQUEIRO (1989). A hibridação com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão indicadas à direita. O asterisco denota regiões não hibridadas.....73

Figura 8 – a) a z): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Akodon paranaensis*, $2n = 44$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 10 e em verde do cromossomo 3; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;.....75

Figura 9 – Cariótipo em banda G de *Akodon paranaensis*, $2n = 44$ (conforme SBALQUEIRO, 1989), sendo os cromossomos numerados abaixo. A hibridação com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita. O asterisco denota regiões não hibridadas.....79

Figura 10 – a) a t): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Akodon serrensis*, $2n = 46$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em vermelho do cromossomo 3 e verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 5 e em verde do cromossomo 6; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;.....81

Figura 11 – Cariótipo em banda G de *Akodon serrensis*, $2n = 46$, onde os cromossomos de *A. serrensis* estão numerados abaixo (SBALQUEIRO, 1989). A hibridação com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita. O asterisco denota regiões não hibridadas.....85

Figura 12 – a) a y): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Thaptomys nigrita*, $2n = 52$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em vermelho do cromossomo 3 e em verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração

de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 5 e em verde do cromossomo 6; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;...87

Figura 13 – Cariótipo em banda G de *Thaptomys nigrita*, $2n = 52$, onde os cromossomos de *T. nigrita* estão numerados abaixo conforme a nomenclatura proposta por SBALQUEIRO (1989). As hibridações com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita.....91

Figura 14 – a) a v): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Necromys lasiurus*, $2n = 34$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em vermelho do cromossomo 3 e em verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 5 e em verde do cromossomo 6; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;...93

Figura 15 – Cariótipo em banda G de *Necromys lasiurus*, $2n = 34$ (SBALQUEIRO, 1989), onde os cromossomos de *N. lasiurus* estão numerados abaixo conforme nomenclatura proposta por MAIA;LANGUTH (1981). As hibridações com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita.....97

Figura 16 – a) a z): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Brucepattersonius griserufenscens*, $2n = 52$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 19 e em verde do cromossomo 3; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;.....99

Figura 17 – Cariótipo em banda G de *Brucepattersonius griserufenscens*, $2n = 52$, onde os cromossomos de BGR estão numerados abaixo, conforme a nomenclatura proposta por SBALQUEIRO (1989). A hibridação com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita. O asterisco denota regiões não hibridadas.....103

Figura 18 – a) a v): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Oxymycterus* sp., $2n = 54$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com

contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 3 e em verde do cromossomo 12; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;.....105

Figura 19 – Cariótipo em banda G de *Oxymycterus* sp. , $2n = 54$, onde os cromossomos de OSP estão numerados abaixo, conforme a nomenclatura proposta por SBALQUEIRO (1989). A hibridação com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita. O asterisco denota regiões não hibridadas.....109

Figura 20 – Idiograma haplóide de MMU com as homeologias dos cromossomos de HSA numerados à direita. Abaixo o número dos cromossomos de MMU e seus respectivos pesos moleculares. Indicações em verde representam a associação 3/18, em azul a 6/12, em verde a 3/18 e em vermelho a 7/19. As caixas coloridas representam as homeologias das associações dos akodontinos e suas correspondências nos cromossomos humanos112

Figura 21 – Idiograma do provável novo modelo de cariótipo do roedor ancestral segundo FROENICKE et al. (2006). A caixa em moldura preta, sugere o rearranjo fusão cêntrica (flecha) entre os segmentos 10q e 11, a partir da identificação da sintenia 7/19 observada entre os akodontinos e representantes roedores do Velho Mundo. Os números abaixo das representações cromossômicas indicam os correspondentes cromossomos humanos.....113

Figura 22 – Árvore filogenética obtida a partir da análise dos dados obtidos pela técnica de ZOO-FISH com sondas de MMU em espécies de akodontinos. NP = número de passos da árvore; IC = índice de consistência; IR = índice de retenção. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores do Bootstrap em porcentagem.....116

Figura 23 – Árvore filogenética obtida a partir da análise dos dados obtidos pela técnica de ZOO-FISH com sondas de MMU em espécies de akodontinos. NP = número de passos da árvore; IC = índice de consistência; IR = índice de retenção. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores do Bootstrap em porcentagem.....117

Figura 24 – Árvore filogenética obtida a partir da análise dos dados obtidos pela técnica de ZOO-FISH com sondas de MMU em espécies de akodontinos, e nos dados de literatura. NP = número de passos da árvore; IC = índice de consistência; IR = índice de retenção. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores do Bootstrap em porcentagem.....119

Figura 25 – Árvore filogenética obtida a partir da análise dos dados obtidos pela técnica de ZOO-FISH com sondas de MMU em espécies de akodontinos e nos dados de literatura. NP = número de passos da árvore; IC = índice de consistência; IR = índice de retenção. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores do Bootstrap em porcentagem.....121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela dos exemplares utilizados neste trabalho com hibridação <i>in situ</i> , parte da tabela que se encontra no Anexo – 1	35
Tabela 2 - Característica dos dUTPs usados na marcação das sondas de DNA.....	39
Tabela 3 – Concentração do conjugado anticorpo para a solução uso.....	44
Tabela 4 - Número do cromossomo de MMU (nas colunas dos haptenos), com as respectivas marcações dos SETs	49
Tabela 5 - Número dos cromossomos de MMU (nas colunas dos haptenos e o fluorocromo tamra) com as respectivas marcações dos SETs	50
Tabela 6 – Propriedades dos filtros da firma Chroma Technology.....	53
Tabela 7 – Protocolo das espécies em que foram preparadas sondas espécie-específicas, mostrando o iniciador utilizado.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ACU – *Akodon cursor*

AMO – *Akodon montensis*

APA – *Akodon paranaensis*

ASE – *Akodon serrensis*

ASY - *Apodemus sylvaticus*

BGR – *Bucepattersonius griserufescens*

CGR - *Cricetulus griceus*

DAPI - 4´6-Diamidino-2-fenil-indol

DOP-PCR - reação de cadeia da polimerase usando-se um iniciador degenerado

d-UTPs - desoxiuraciltrofosfatos

FACS - *Fluorescence Activated Chromosome Sorting*

FISH – *Fluorescence in situ hybridization*

GISH - *Genomic in situ hybridization*

HSA - *Homo sapiens*

MMU - *Mus musculus*

NLA – *Necomys lasiurus*

OSP – *Oxymicterus* sp

OIR - *Otomys irroratus*

PAUP - *Phylogenetic Analysis Using Parsimony*

PCR – reação em cadeia da polimerase

RNO - *Rattus norvegicus*

RPU - *Rhebdomys pumilio*

TNI - *Thaptomys nigrita*

ZOO-FISH - *Fluorescence in situ hybridization* entre espécies distintas de animais

RESUMO

Foram analisados os cariótipos de oito espécies de roedores da Tribo Akodontini pertencentes aos gêneros: *Akodon* (4 espécies), *Necomys* (1), *Thaptomys* (1), *Brucepattersonius* (1) e *Oxymycterus* (1), através do emprego de FISH com sondas cromossomo-específicas de *Mus musculus*, tendo por objetivos: construir um mapeamento cromossômico destas espécies; determinar as ocorrências de sentenias cromossômicas e associações sintênicas; e analisar as relações filogenéticas entre as espécies akodontinas, bem como, entre estas e as descritas na literatura. Os resultados aqui obtidos são inéditos para roedores sul-americanos. Após as hibridações, somente as sondas MMU-10 e -18 não determinaram sinais confirmatórios em *Akodon serrensis* e *Brucepattersonius griserufescens*, respectivamente. Para as demais espécies todas as sondas hibridaram em pelo menos uma região dos seus genomas. Verificaram-se as presenças de quatro associações constantes, sendo que a MMU-7/19, foi também observada em roedores europeus, asiáticos e africanos descritos na literatura, servindo, portanto, de elo entre os roedores do Velho Mundo e os Neotropicais. As outras três associações (3/18, 6/12 e 8/13), são exclusivas dos Akodontini, sendo que MMU-3/18 e -6/12, só foram detectadas nos roedores dos gêneros *Akodon* e *Necomys*, podendo, portanto, serem consideradas sinapomorfias dentro deste grupo. A associação sintênica MMU-8/13 foi observada também em *Thaptomys* e *Oxymycterus*, o que pode revelar uma unidade entre as espécies da Tribo. Cinco cromossomos de MMU (4, 9, 14, 18 e 19) permaneceram constantes, *in toto*, após as hibridações, estes cromossomos conservados também foram relatados na literatura. As análises filogenéticas, que utilizaram a parcimônia e a procura heurística, revelaram a formação de uma nítida separação das espécies do gênero *Akodon* e *Necomys* em relação às demais espécies, independente da incorporação ou não dos dados da literatura. Estas análises também identificaram a formação de grupos que separam os roedores akodontinos dos demais.

ABSTRACT

This essay analysis the karyotype of eight species of the rodent Akodontini Tribe, including the genera: *Akodon* (four species), *Necomys* (one), *Thaptomys* (one), *Brucepattersonius* (one) and *Oxymycterus* (one). The chromosomes were analyzed through *in situ* hybridization using chromosome specific probes of *Mus musculus*, with the purpose of to building a group map of this species by detecting the chromosomal rearrangements responsible for the karyotype variation in this Tribe in order to analyze the phylogenetic relationships among these species and comparing it to the literature data. The result of the hybridization of the South American rodents, here described, are unpublished. With the hybridizations, only the probes MMU-10 and -18 presented no signals in *Akodon serrensis* and *Brucepattersonius griserufescens*, respectively. The probes identified almost one region to the other species. We observed four associations, in which the MMU-7/19, have been verified in other rodents from Europe, Asia and Africa, literature data, and might represent one link with the Old World and Neotropical rodents. The other three associations (3/18, 6/12 and 8/13) are restricted to Akodontini, while the MMU-3/18 and -6/12, only detected in genera *Akodon* and *Necomys*, representing a synapomorphy inside this group. The association 8/13 was observed in the species *Thaptomys nigrita* and *Oxymycterus* sp., making the unification of the species into the Tribe. Five constant MMU probes (4, 9, 14, 18 and 19) were *in toto* verified, as they are documented in the literature data. The phylogenetic analysis, used parsimony and heuristic search detected two sharp separations of the *Akodon* and *Necomys* genera as well as to the other species, which is all new data. Those analyses identify the separation of the Akodontini groups from the other rodents.

I. INTRODUÇÃO

1. ORDEM RODENTIA

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os roedores são evolutivamente bem adaptados, pois estão presentes em praticamente todos os tipos de nichos, podendo ser encontrados nos mais diversos tipos de clima, desde os mais quentes e desérticos, passando por regiões tropicais e chegando aos limites mais frios, como a Tundra gelada, porém não são observados no Continente Antártico. Estão adaptados a grandes altitudes, conferindo assim uma ocorrência desde litorânea até montanhosa. As espécies de roedores também adquiriram adaptações diversas para sua sobrevivência, podendo assim ser: terrestres, arborícolas, fossoriais, saltatórios (formas de desertos) ou semi-aquáticos, mas não existem formas marinhas (NOWAK; PARADISO, 1983; SARAGE; LONG, 1986).

Esta Ordem apresenta uma diversidade de tamanho bem marcante, sendo normalmente pequenos quando comparados com outras ordens da classe MAMMALIA (LINNAEUS, 1758). A maior espécie desta ordem é representada pela capivara, *Hydrochaeris hydrochaeris*, pertencente à família Hydrochaeridae, encontrada na Região Neotropical, podendo chegar a 1,3 m de altura e pesar até 50 kg. As menores espécies são representadas pela família Muridae, onde seus exemplares podem apresentar baixo tamanho corporal de até 10 cm e pesar até 5g (SARAGE; LONG, 1986).

Quanto à forma do crânio, esta é bem característica, sendo as maxilas destacadas pela presença de um par de incisivos conspícuos nas maxilas superior e inferior, que crescem constantemente. A dentição possui tendência à redução no tamanho dos pré-molares sendo a fórmula dentária básica composta pelos incisivos e P4 – M3. Já nos cricetídeos a fórmula dentária é basicamente composta por: incisivos = 1\1, caninos = 0\0, pré-molares = 2\1, molares = 3\3 = 22. Os caninos são ausentes, o que acarreta na formação de um espaço o qual permite o acúmulo de

grande quantidade de alimento, que é repassado para trás sofrendo a ação maceradora dos molares, algumas espécies podem apresentar também ausência dos pré-molares. A mandíbula não possui superfície de encaixe com o crânio, o que permite a execução de movimentos de rotação na mastigação (SARAGE; LONG, 1986; WILSON; REEDER, 1992).

O grande sucesso das radiações adaptativas conquistadas por esta ordem, segundo LANDRY JUNIOR (1970), diz respeito à ampla variedade de hábitos de alimentação que, predominantemente herbívora, lança mão de outras fontes de alimento, podendo assim ser insetívoras, piscívoras, carnívoras ou onívoras.

Segundo ANDERSON; JONES (1967), a Ordem Rodentia, dentre os mamíferos, representa uma das mais numerosas, devido a sua grande capacidade adaptativa. Nela existem cerca de 1700 espécies vivas, o que perfaz aproximadamente 11% dos mamíferos do Mundo. NOWAK; PARADISO (1983) classificaram os roedores em 29 famílias viventes, com 380 gêneros e 1687 espécies, o que garante a esta Ordem o maior número de espécies na classe Mammalia.

Para SARAGE; LONG (1986), os roedores estão agrupados em 35 Famílias e 350 Gêneros com aproximadamente 1600 espécies, dados relativamente próximos aos de NOWAK; PARADISO (1983). Na América do Sul ocorrem cerca de 450 espécies de roedores, o que corresponde a 43% das espécies de mamíferos do continente (REIG, 1984). NOWAK (1999), descreve que 45% das espécies de mamíferos viventes na América do Sul, são roedores, e a metade dos remanescentes são morcegos e insetívoros na sua maioria noturnos o que dificulta o seu estudo e classificação, podendo acarretar um erro de estimativa do número de espécies.

PATTERSON (1994) sugere que a Região Neotropical – que se estende do México tropical e Antilhas até o sul da Terra do Fogo – abriga um quarto da fauna de mamíferos terrestres do Mundo, incluindo 1145 espécies em 12 Ordens, onde mais da metade destas espécies estaria na Ordem Rodentia.

Um ponto importante a ser lembrado é a designação sinônima de espécies de mamíferos, assim PATTERSON (1996) assume que aproximadamente 15% dos

nomes de todas as espécies válidas, a partir de 1982, são consideradas sinônimas. O autor sugere que a taxa de sinonímia esta relacionada positivamente com o tamanho corpóreo do animal, onde os valores estimados para alguns grupos seriam: 78% de sinonímia para edentatas, 59% para primatas, 56% para carnívoros e ungulados, marsupiais 43%, morcegos 39%, roedores 36% e lagomorfos 26%. Com isto, ele propõe que a fauna terrestre de mamíferos Neotropicais seria composta de 1170 espécies, onde 610 espécies (aproximadamente 52% de todos os mamíferos) estariam na Ordem Rodentia.

Em 2000, PATTERSON publicou uma nova lista de mamíferos para a América do Sul – exceto: Guiana, Bolívia e Paraguai – desde a última publicação em 1992, onde sete novos gêneros e 57 novas espécies foram descritas em seis Ordens (Didelphimorphia – três espécies, Paucituberculata - uma, Insectivora – três, Chiroptera – nove, Primates - seis e Rodentia - 35). Destas 60% são espécies novas de roedores, sendo que 38% são Muridae (Sigmodontinae) distribuídas em cinco Tribos: nove em Akodontinos, seis em Oryzomynos, três em Phyllotinos, duas em Thomasomynos, uma em Ichthyomyno e também a atribuição do gênero *Punomys* considerado *incertae sedis* (STEPPAN, 1999), sendo que sete gêneros novos são propostos para a Subfamília Sigmodontinae: três Oryzomyini, dois Akodontini e dois Phyllotini.

Em detrimento a descoberta e descrição de novas espécies de mamíferos que tem ocorrido continuamente PATTERSON (2002), enfatiza a necessidade de um esforço de coleta para o aprimoramento e fundação de novas coleções e museus, salientando a importância destas para os pesquisadores e para o uso público destes dados. O autor comenta também sobre a existência de gêneros de difícil taxonomia onde somente as características morfológicas não são suficientes para a diferenciação em espécies, sendo necessário realizar a cariotipagem e posterior comparação com dados morfológicos para uma correta classificação do exemplar.

Desta forma também, os roedores em geral, têm-se mostrado um excelente grupo para estudos citogenéticos, principalmente em espécies pertencentes às Famílias Cricetidae, Echimyidae, Caviidae, Hydrochoeridae, Dasyproctidae, Ctenomyidae e Muridae, pois apresentam um histórico evolutivo bastante complexo, como pode ser observado através da grande diversidade morfológica e cariológica

evidenciadas por algumas revisões citogenéticas realizadas (KASAHARA; YONENAGA-YASSUDA, 1984; SILVA, 1999).

Os roedores também merecem uma atenção, pois estão relacionados à doenças que podem acometer ao homem. Segundo SILVA (1984), os roedores silvestres estão sendo utilizados como animais de laboratório para emprego em pesquisas parasitológicas e virais, pois muitas das espécies são hospedeiras naturais de agentes patogênicos. Os roedores também podem ser disseminadores de outras enfermidades como: a helmintoses, a febre hemorrágica e a hantavirose (GARDENAL, 2005; MURÚA; PADULA, 2005).

Existem também espécies que são verdadeiras pragas, por causarem enormes prejuízos às lavouras. Neste sentido, estudos na Austrália (em *Mus domesticus*) e Indonésia (em *Rattus argentiventer*) estão tentando promover um controle destas pragas através da construção de armadilhas tipo barreiras, controle biológico, minimização de refúgio e alimento, bem como controle de fertilidade destes roedores (JACOB, 2005).

Existe uma grande discordância entre os autores no que diz respeito à classificação dos roedores em categorias subordinais, onde normalmente utilizam-se as diferenças da estrutura craniana, os padrões do músculo masseter e sua relação com o conduto infraorbitário. Assim, SIMPSON (1945) e ANDERSON (1967) propõem três subordens: Sciuromorpha (sete famílias, 71 gêneros e 393 espécies), Hystricomorpha (18 famílias, 60 gêneros e 185 espécies) e Myomorpha (nove famílias, 223 gêneros e 1109 espécies). A primeira é representada pelo esquilo, um roedor de vida arborícola, com cauda peluda que serve como uma espécie de pára-quedas quando este salta; a segunda é composta pelos maiores roedores, entre eles o porco-espinho, a capivara, o ouriço-cacheiro etc., e a última subordem, a mais numerosa, com ratos de diversos tamanhos e que habitam os mais diversificados ambientes, sendo inclusive encontrados em residências humanas.

Esta classificação quanto à fixação do músculo masseter continua sendo importante e serve como referência na taxonomia dos roedores. Desta forma, SARAGE; LONG (1986), mantiveram a classificação da Ordem Rodentia em três subordens viventes e uma extinta. A condição mais primitiva, com o encaixe do masseter no crânio limitado na área do arco zigomático, é observada nos Protrogomorpha, como o *Paramys* do Paleoceno. Os Hystricomorpha possuem um

músculo masseter pouco especializado, sendo que este passa pelo forâmen infra-orbital para se encaixar anteriormente aos olhos. Nos Sciuromorpha o masseter também é pouco especializado, pois se encaixa anteriormente na região orbital. Já os Myomorpha apresentam uma fixação do masseter anteriormente à região orbital como nos Sciuromorpha e a outra extremidade passa pela área orbital e através do forâmen infra-orbital.

A diversidade morfológica observada nesta ordem é causa de muita polêmica entre os taxonomistas (VAUGHAN, 1978), onde várias propostas de classificação têm sido apresentadas, destacando-se as de SIMPSON (1945), WOOD (1955; 1965), ANDERSON (1967), MCKENNA (1975), CHALINE; MEIN; PETTER (1977), REIG (1981) e MUSSER; CARLETON (1993). Na tentativa de esclarecer esta polêmica novos trabalhos foram propostos, conforme se segue.

A proposta filogenética de CATZEFLIS et al. (1993), utilizando a hibridação DNA-DNA entre diversas espécies de roedores das subfamílias Murinae, Gerbillinae, Cricetidae, Arvicolinae, Sigmodontinae, Neotominae e Spalacidae, apresentou uma nítida separação entre os Murinae (*Mus*, *Apodemus* e *Rattus*), dos Cricetinae (*Cricetulus*) e dos Sigmodontinae (*Akodon* e *Oryzomys*).

No trabalho de revisão da Tribo Phyllotini, STEPPAN (1995) propôs uma filogenia para a subfamília Sigmodontinae, sendo que os resultados obtidos caracterizaram os Sigmodontinae como formas exclusivas de roedores sul-americanos. Em uma publicação mais recente, STEPPAN; ADKINS; ANDERSON (2004) procuraram caracterizar uma divergência dos roedores Muroidea baseado em múltiplos dados de genes nucleares. Eles analisaram quatro genes nucleares (GHR, BRCA1, RAG1 e MYCC) com um total de 6400 nucleotídeos, comparando 53 gêneros e 64 espécies. Os resultados revelaram um panorama de classificação que concorda com a antiga proposta de REIG, 1980 e 1984. Esta proposta, dos Sigmodontinae, como entidade sul-americana foi também corroborada que voltou a ser evidenciada pelos trabalhos de STEPPAN, 1995 e D'ELÍA, 2000.

STEPPAN; ADKINS; ANDERSON (2004) sugeriram algumas estimativas de tempo de divergência entre os otomyinos dos murinos de 5,4 a 6,6 milhões de anos e a divergência entre *Parotomys* (que é altamente relacionado com *Otomys* e que são roedores Africanos considerados ancestrais dos roedores Norte Americanos) e

Mus seria de 8 a 10 milhões de anos. Quanto às propostas de divergência dos Sigmodontinae e Neotominae são altamente controversas (D'ELÍA, 2000; PARDIÑAS, D'ELÍA, ORTIZ, 2002). Quatro principais modelos de diversificação já haviam sido propostos e os dados destes autores vêm ao encontro com o modelo de Marshall (MARSHALL, 1979), que considera a entrada de um pequeno número de

Proposta revisada de classificação dos Muroidea, segundo STEPPAN; ADKINS; ANDERSON (2004):

Muroidea**Spalacidae****Nesomyidae****Cricetidae**

Cricetinae

Arvicolinae

Neotominae

Tylomyinae

Sigmodontinae

Muridae

Murinae

Deomyinae

Gerbillinae

Lophiomyinae, Muroidea *incertae sedis*Platacanthomyinae, Muroidea *incertae sedis*Myospalacinae, Muroidea *incertae sedis*

Assim, adotaremos no presente trabalho a classificação filogenética para famílias de mamíferos da América do Sul proposta por REIG (1981), que é apresentada a seguir:

Classe MAMMALIA Linnaeus 1758

Subclasse THERIA Parker et Haswell 1897

Infraclasse TRIBOSPHENIDA McKenna 1975

Supercorte EUTHERIA Gill 1972

Corte EPITHERIA McKenna 1975

Magnaordem PREPTOTHERIA McKenna 1975

Grandeordem GLIRES Linnaeus 1758

Ordem RODENTIA Bowdich 1821

Subordem SCIUROGNATHI

Infraordem MYOMORPHA Brandt 1855

Superfamília MUROIDEA Miller et Gidley 1918

Família CRICETIDAE Rochebrune 1883

Subfamília SIGMODONTINAE Wagner 1843

Tribo AKODONTINI Vorontsov 1959

linhagens de roedores na América do Sul a aproximadamente 5 a 7 milhões de anos atrás, quando o nível do mar na ponte Panamenha estaria baixo. Os dados por eles encontrados sugerem que o ancestral da Tribo *Oryzomyia* (táxon hipotético precursor dos cricetídeos sul-americanos) teria chegado a América do Sul a 6 milhões de anos, antes da formação do Istmo do Panamá. Eles consideram que se a rápida radiação foi consequência da expansão pela América do Sul, os dados moleculares que eles trabalharam puderam evidenciar claramente que três linhagens teriam migrado e estariam envolvidas nesta colonização que seriam: um ancestral dos *Oryzomyia*, alguns *Sigmodontini* e algumas espécies semi-aquáticas da Tribo *Ichthyomyini*, e que talvez tenha ocorrido em tempos diferentes. Estas constatações são controversas à hipótese de que a América do Norte teria sido o centro de diversificação dos *Sigmodontinae*, e apóiam um modelo autóctone, de que a grande radiação tenha ocorrido na América do Sul. A causa desta rápida radiação foi à colonização da América do Sul por poucas linhagens de sigmodontinos, seguido por uma rápida linha de expansão, fragmentação e divergência adaptativa (HOOPER; MUSSER, 1964).

1.2. HISTÓRICO PALEONTOLÓGICO DOS ROEDORES E DA FAMÍLIA CRICETIDAE NA AMÉRICA DO SUL

Durante o Triássico tardio uma família de mamíferos parecidos com répteis se desenvolveu em uma forma muito similar aos roedores, estes eram os *tritylodontes* que persistiram por quase 50 milhões de anos até meados do Jurássico. Eles variavam entre o tamanho de ratos a coelhos, apresentavam os dentes incisivos alargados e com um grande espaço entre eles, o diastema, e a bateria de dentes com multicúspides paralelamente relacionado aos dos roedores. Estas formas foram encontradas em todos os Continentes exceto na Antártica e na Austrália e deveriam ocupar um tipo de nicho ecológico similar ao ocupado pelos roedores atualmente (ANDERSON; JONES, 1967; SARAGE; LONG, 1986).

Os multituberculares, outro grupo de mamíferos parecidos com roedores e contemporâneos aos *tritylodontes*, são bem documentados no Jurássico Tardio, sendo que seus ancestrais perduraram até o Triássico Tardio. Uma grande variedade e estoque destes foram encontrados no Hemisfério Norte e, como os

tritylodontes, tinham os dentes incisivos grandes e cortantes, com diastema e, também, a bateria de dentes com multicúspides. Ocupavam o mesmo nicho ecológico que os tritylodontes e registros fósseis foram encontrados até o Terciário, sendo extintos no Eoceno Tardio. Após este declínio, notou-se que os roedores se tornaram abundantes, devido concomitantemente ao predomínio de uma vegetação com sementes e grãos no Triássico, sendo assim estes foram os vertebrados mais especializados que podiam roer os duros tecidos das plantas da época (SARAGE; LONG, 1986; ROWE, 1993).

Os registros fósseis mais antigos dos roedores Protogomorfos, Paramyidae, remontam do Paleoceno Superior, cujos descendentes têm registros no Eoceno da América do Norte e Eurásia. Apresentavam fórmula dental: 1/1, 0/0, 2/1, 3/3, encontravam-se em uma posição geralmente ancestral aos antigos roedores, possuíam uma estrutura do zigomasseter como muitos roedores do Eoceno e alguns do Oligoceno; os caviomorfos da América do Sul formam um grupo bem relacionado com estas formas, e os primeiros geomyoides, muroides e dipodoides possuem certas características que sugerem a derivação através de um grupo ancestral em comum (ANDERSON; JONES, 1967; VAUGHAN, 1978).

Fósseis de cricetídeos primitivos apresentam registros na América do Norte, que apontam este continente como o local de origem dos Sigmodontinae (REIG, 1978, 1980, 1981).

Contrariamente, HERSHKOVITZ (1972) propõe que os sigmodontinos tiveram uma origem eurásiana ou africana, tendo alcançado o continente Sulamericano, através dejangadas naturais, onde se diversificaram e originaram aproximadamente 40 gêneros e 200 espécies viventes. As postulações deste autor fundamentam-se na não constatação de sigmodontídeos na América do Norte, no Plioceno Superior, levando em conta as relações intercontinentais e o grau e direção de diferenciação e migração dos roedores na América Central, do Sul e Ilhas do Caribe.

REIG (1981), sugere que os cricetídeos atuais da América do Norte descendem de ancestrais similares a *Copemys* (Mioceno Superior), que por sua vez teriam se originado de linhagens de Cricetodontini (Oligoceno) encontrados na América do Norte ou Eurásia (aceitando serem formas emigrantes). Admite também que os cricetídeos seriam encontrados na América do Norte desde o Oligoceno

Inferior e que a Subfamília Cricetodontinae seria o tronco principal para a diferenciação das demais Subfamílias dos Cricetidae (REIG, 1980).

No entanto, GARDNER; PATTON (1976) entendem que os roedores neotropicais seriam um produto da radiação adaptativa ocorrida no Terciário Médio ou Final após a entrada, no continente, de um estoque primitivo. E, baseados em dados cromossômicos, afirmam que seria improvável uma diferenciação na América Central antes da sua chegada na América do Sul.

Várias hipóteses foram postuladas sobre a chegada desses roedores na América do Sul, uma vez que a formação da ponte panamenha só teria ocorrido há cerca de três milhões de anos (Plioceno Superior). Uma delas considera que os cricetídeos são componentes modernos da fauna de mamíferos da América do Sul e teriam vindo da América do Norte, através da América Central, após a formação da ponte panamenha (PATTERSON; PASCUAL, 1968, 1972).

Uma hipótese alternativa, considera que os Sigmodontinae seriam relativamente antigos na fauna da América do Sul, tendo alcançado este Continente no início do Mioceno, ou até anteriormente, através de um transporte passivo, como as jangadas naturais, se diferenciando ao invadirem novas regiões, e conseqüentemente, ocupando novos nicho ecológicos (HERSHKOVITZ, 1969, 1972; SAVAGE, 1974; REIG, 1978, 1980, 1981, 1984).

Para MARSHALL (1979), os sigmodontíneos teriam se originado na América do Norte a mais de sete milhões de anos (Mioceno Superior) e, por meio de transporte passivo, chegado à América do Sul, através da América Central, entre sete e cinco milhões de anos (Mioceno Superior). Na América do Sul, estas formas teriam ocupado as savanas e pradarias do Norte (Colômbia, Venezuela e Guianas). A partir de três milhões e quinhentos mil anos atrás estes roedores se dispersaram para o Sul, pelas savanas dos contrafortes orientais da Cordilheira dos Andes, até os pampas argentinos, onde existem registros fósseis de cricetídeos em depósitos desta época.

REIG (1984), sugere que os padrões de distribuição geográfica dos sigmodontinos teriam ocorrido em distintos episódios cladogênicos ao longo da Cordilheira dos Andes, indicando que os akodontinos e filotinos teriam se dispersado nos pampas Argentinos a partir de centros de origem das regiões andinas.

D'ELÍA (2003), a partir de estudos de DNA nuclear e mitocondrial associados a dados paleontológicos, propôs que as distintas linhagens de sigmodontine que hoje habitam as províncias de Buenos Aires e o Pampa Argentino teriam ocorrido entre cinco a seis milhões de anos. De posse destes dados, o autor refuta as hipóteses de REIG (1986,1987) que sustenta que os akodontinos estariam envolvidos com um estoque oryzomyino, que por sua vez, teriam originado os filotinos. Porém de acordo com os dados de D'ELÍA, os filotinos e os oryzomyinos estariam fortemente relacionados com os abrothricinos e este fato poderia explicar porque REIG (1986,1987), que considerava abrothricinos como típicos akodontes, sugeriu a relação filogenética entre oryzomyinos, akodontinos e filotinos. O autor também sugere que os filotinos e oryzomyinos não sejam grupo irmão dos sigmodontinos remanescentes, nem tão pouco um grupo parafilético em relação a eles. Assim refuta REIG (1980, 1986), que admite que o clado dos sigmodontinos seja a base da cladogênese deste grupo.

1.3. CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIA DA FAMÍLIA CRICETIDAE NA AMÉRICA DO SUL

A família Cricetidae engloba 55% das espécies de roedores sulamericanos, o que representa 22% das espécies de mamíferos de todo o continente (REIG, 1981; 1984; 1987). Esta família está dividida em duas subfamílias: Sigmodontinae, na maioria roedores da América do Sul e Neotominae, os roedores da América do Norte.

Esta divisão em subfamílias foi inicialmente sugerida por RINKER (1954, cf. REIG, 1980, 1981), através de estudos comparativos. Porém, HERSHKOVITZ (1969, 1981), prefere classificar os cricetídeos da América do Sul junto com os da América do Norte, como subfamília Cricetinae, família Muridae, que inclui a tribo Sigmodontini (América do Sul) e Peromyscini (América do Norte). REIG (1980, 1981), utiliza a dicotomia Sigmodontinae e Neotominae, por razões fenéticas e filogenéticas.

A dicotomia Sigmodontinae e Neotominae, foi sugerida por HOOPER; MUSSER (1964), que desenvolveram estudos filogenéticos baseando-se nas morfologias da glândula e do báculo penial dos murídeos, destacando dois tipos

básicos. Um tipo simples, com um báculo simplificado que é observado em indivíduos da subfamília Neotominae, e um tipo complexo, com o báculo tridigitado que ocorre nos murinos, gerbilinos, etominos, mesominos, nos cricetídeos do Velho Mundo e nos neotropicais. Sendo assim, o tipo simples seria derivado do tipo complexo através de um processo de derivação por perda de partes.

As espécies dessa família podem apresentar hábitos gregários, viver em casais ou solitários. Algumas espécies podem apresentar costumes nômades e alta capacidade reprodutiva na presença de fartura de alimentos e de espaço físico, tendendo a aumentar o número de indivíduos até que o ambiente torne-se escasso, para aí então procurar novos espaços.

Os cricetídeos apresentam controles populacionais, que podem ser tanto pela saída de indivíduos da comunidade como pela ocorrência de elevadas mortandades. Estes aspectos são bem observados nas espécies que procriam durante todo o ano, como são os casos daquelas que habitam regiões quentes do mundo e as que apresentam ninhadas com uma média de três filhotes, mesmo quando em cativeiro (MELLO, 1986). Outro aspecto importante diz respeito ao período de gestação destes animais, que pode variar de 21 a 30 dias, e logo após a fêmea dar a cria, ela está apta para novo acasalamento.

Muitos Cricetidae são de importância médica, por serem possíveis reservatórios naturais do *Schistosoma mansoni* (DIAS; PIRES; PINTO, 1980). Por outro lado, em *Akodon cursor* foi encontrada uma nova espécie de parasita da cavidade abdominal, *Litomosoides chagasfilhoi* (Nematoda: Filarioidea) (MORAES NETO; LANFREDI; DE SOUZA, 1996, 1997).

Uma doença grave e freqüentemente fatal é a hantavirose, cujo vírus é amplamente encontrado em indivíduos da subfamília Sigmodontinae (ESCUTENAIRE; CHALON; VERHAGEN, 2000). Na América do Sul os registros mais abundantes estão associados a exemplares, principalmente, dos gêneros *Abothrix*, *Eligmodontia*, *Oligoryzomys* e *Reithrodon* (LOZADA; GUTHMANN; BACCALA, 2000). No Brasil os casos de hantavirose humana foram estudados principalmente no Estado de São Paulo, porém as análises sobre os hospedeiros naturais são quase nulas, destacando-se a quase inexistência de conhecimentos biológicos e ecológicos das espécies transmissoras da doença no território nacional (JOHNSON; DE SOUZA; FERREIRA, 1999).

Na tentativa de reverter este quadro, estudos estão sendo realizados em áreas de ocorrência de casos humanos de hantavirose, como o que é observado no oeste de Santa Catarina. Neste local foram verificadas titulações altas do hantavirus em espécies de Akodontinos (*Akodon montensis*, *Thaptomys nigrita* e *Oxymycterus judex*), e de *Tripanossoma cruzi* em *Akodon montensis* e *Oxymycterus judex*, o que demonstra serem estas espécies importantes reservatórios naturais, reforçando a necessidade de mais estudos e monitoramento destas populações (OLIVEIRA et al., 2005).

Com relação à agricultura, algumas espécies de Sigmodontinae são consideradas como importantes causadoras de sérios danos com repercussões econômicas, mas isto se deve às devastações dos seus habitats naturais (CARTAYA; AGUILERA, 1983).

1.4. A TRIBO AKODONTINI

Entre os sigmodontíneos destaca-se a tribo Akodontini - uma das mais numerosas com aproximadamente 35% do total da diversidade da subfamília -, composta por 12 gêneros e 63 espécies (MUSSER; CARLETON, 1993), são caracterizados por sua forma semelhante ao rato, com hábitos que variam de onívoros a insetívoros (REIG, 1981, 1984).

A Tribo apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo que a maior parte de seus gêneros e espécies estão concentrados nas regiões mais centrais da Cordilheira dos Andes, que é proposta como sendo a área original de diferenciação dos akodontinos (REIG 1984, 1987). Muitos autores sugerem que esta Tribo seja monofilética e evolutivamente derivada de um estoque orizomino primitivo (GARDNER; PATTON, 1976; BIANCHI et al., 1971; REIG 1977, 1984).

LIASCIVICH; REIG (1989), propõem três frentes de radiação a partir do centro protopuma de origem das espécies de akodontinos, principalmente o gênero *Akodon* que se dispersaram pela América do Sul. Uma linhagem Sul teria diversificado ao longo do Sul dos Andes com poucas alterações cariotípicas em relação ao $2n = 52$ ancestral. A linhagem Norte teria sofrido uma redução do número diplóide, culminando no $2n = 18$ de *A. urichi* da Venezuela, diversificado ao longo dos Andes Central e Norte. A maior radiação seria a Centro-Sul, ao longo do Chaco e Pampas,

que teria originado os cariótipos com $2n = 40 - 44$, que foram gradativamente reduzidos por eventos de fusão, dando origem aos cariótipos com $2n = 24$, 16 e 14, observados no Nordeste e Centro-Sul do Brasil.

Dados de análises cladísticas baseadas em sequências de DNA nuclear e mitocondrial, em roedores sigmodontinos, corroboram a condição monofilética dos akodontinos (D'ELÍA, 2003). Os dados deste autor refutam, porém, a hipótese de que os akodontinos tenham evoluído a partir de um estoque oryzomino e que posteriormente originou os filotinos, já que os dados cladísticos sugerem que os filotinos e oryzominos sejam distantemente relacionados com os akodontinos.

1.4.1. O GÊNERO *Akodon*

O gênero *Akodon* é o mais numeroso com 45 espécies (MUSSER; CARLETON, 1993). Está amplamente distribuído pela América do Sul, principalmente no Brasil (nos Estados: Pernambuco, Bahia, Distrito Federal, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), e em regiões fronteiriças da Argentina, do Paraguai, do Chile, da Venezuela e do Uruguai. É um gênero que apresenta uma taxonomia muito complexa e pouco compreendida em relação aos demais roedores, por incluir espécies com grau morfológico de similaridade maior que nos demais gêneros. Possuem aspecto de ratos, são de alimentação onívora. Quanto ao habitat podem ser terrestres ou galerícolas. A coloração do pêlo pode variar do verde-oliváceo, passando pelo marrom-avermelhado, chegando até o cinza. Caracterizam-se por apresentarem o comprimento da cauda igual ou menor que o comprimento do corpo. Unhas normais para o grupo, mas variáveis de tamanho. As mamas estão dispostas em duas fileiras compostas por quatro mamas cada. Crânio com região interorbital e caixa craniana estreita (GYLDENSTOLPE, 1932).

A similaridade fenotípica encontrada em várias de suas espécies, que é uma característica importante neste gênero e acarreta problemas taxonômicos, contrasta com sua ampla multiformidade cariotípica (SBALQUEIRO, 1989; CHRISTOFF et al., 2000). Assim, observa-se uma grande variação tanto no número diplóide, $2n = 10$ (SILVA; YONENAGA-YASSUDA, 1998) a 46 cromossomos (SBALQUEIRO, 1989), como no número de braços dos cromossomos autossômicos ($NA = 14 - 16$ a 46).

Uma característica do gênero é a presença de um pequeno par de cromossomos metacêntricos (BIANCHI et al., 1971).

Esta variação cariotípica tem sua maior expressividade na espécie *A. cursor*, com $2n = 14$, 15 e 16 cromossomos, ocorrendo desde Pernambuco ($2n = 16$) até o Paraná ($2n = 14$ a 16 , SBALQUEIRO; NASCIMENTO, 1996). Para verificar a possível variação genética nesta espécie NOGUEIRA; FAGUNDES (2005), analisaram polimorfismos de fragmentos de restrição do gene citocromo b em 50 exemplares de Pernambuco, Bahia, Espírito Santo e São Paulo, que resultou em 13 haplótipos. A partir da análise conjunta dos haplótipos do gene citocromo b e dados cariotípicos, foram observados agrupamentos entre os indivíduos das populações do Nordeste em relação às do Sul-Sudeste. Mesmo com a formação desses agrupamentos, em ambos os clados todas as formas cariotípicas foram encontradas, verificando-se apenas uma maior porcentagem da forma $2n = 16$ no Nordeste e menor no Sul-Sudeste, enquanto que a forma $2n = 14$ apresentou-se abundante na região Sul-Sudeste e ausente no Nordeste. Este estudo reforça a manutenção de apenas uma espécie *Akodon cursor*, apesar da ocorrência de polimorfismo cariotípico e variações geográficas interpopulacionais identificadas pelo gene citocromo b.

1.4.2. O GÊNERO *Brucepattersonius*

Este gênero foi descrito recentemente por HERSHKOVITZ (1998), e incluindo quatro novas espécies num total de seis: *B. albinasus*, *B. soricinus*, *B. griserufescens* e *B. igniventris*. Nesta mesma publicação o autor revisa e considera a espécie *Oxymycterus iheringi* THOMAS, como pertencente ao gênero *Brucepattersonius* e recebe o nome de *Brucepattersonius iheringi*. O gênero também apresenta uma espécie ainda não nomeada, *Brucepattersonius* sp., que ocorre na região de Misiones na Argentina.

Este gênero apresenta distribuição no Sul - Sudeste do Brasil, desde o norte do Rio Grande do Sul até o leste de Minas Gerais e, provavelmente, no Espírito Santo. Na Argentina foi coletado na Província de Misiones. Apresenta uma coloração onde geralmente o dorso é marrom escuro, a lateral do corpo pálida,

ventre podendo ser de coloração cinza, mas também variando de ocre a alaranjado. Caracterizam-se por possuírem pequenos olhos e orelhas, corpo alongado e pequeno, com membros pequenos, e se alimentam quase que exclusivamente de insetos.

BONVICINO; PENNA-FIRME; SEUÁNEZ (1998) analisaram o cariótipo de dez exemplares de *B. griserufescens*, através de bandeamento G, que mostrou $2n = 52/NA = 52 - 53$ devido a uma inversão pericêntrica em um dos cromossomos do par 2, ocorrente em dois indivíduos. O cariótipo dos demais oito exemplares mostrou o complemento autossômico composto por 24 pares de acrocêntricos e um par médio biarmado, o cromossomo X é um grande metacêntrico e o Y é o menor acrocêntrico.

MARES; BRAUN (2000), descreveram três novas espécies ao gênero *Brucepattersonius* da Província de Misiones, Argentina, e a análise cromossômica em duas delas, *B. paradisus* e *B. misionensis*, mostrou $2n = 52$, sendo os cromossomos do tipo acrocêntricos e/ou subtelocêntricos em uma escala de grande a pequeno, porém consideram os cromossomos X e Y indistinguíveis dos autossomos. Os autores não apresentam os dados cariotípicos sobre a terceira espécie, *B. guarani*.

1.4.3. O GÊNERO *Necromys*

Este gênero foi considerado por muito tempo como subgênero de *Akodon* e era denominado *Bolomys* (CABRERA, 1961). É um gênero pertencente à tribo Akodontini, e já foi classificado por vários autores como *Akodon* e *Zygodontomys* (BIANCHI, et al., 1971; REIG, 1978). Mais recentemente, voltou a ser utilizada a denominação *Necromys* Ameghino, 1889 (= *Bolomys* Thomas, 1916) (GOHL; PARESQUE; FAGUNDES, 2005; D'ELIA et al., 2005).

Apresenta oito espécies viventes: *Necromys amoenus*, *N. benefactus*, *N. lactens*, *N. lasiurus*, *N. lenguarum*, *N. obscurus*, *N. pixuna* e *N. temchuki*, e duas espécies fósseis: *N. bonapartei* e *N. cinofer*. Sua distribuição geográfica compreende vários países da América do Sul como: Peru, Argentina, Paraguai, Brasil, Uruguai e Equador. No Brasil é encontrada uma única espécie, *Necromys lasiurus*, que é

ocorre a partir do Rio Amazonas, desde o Norte/Nordeste (Pará, Ceará, Pernambuco), Tocantins, Distrito Federal, Mato Grosso, Minas Gerais até o Sul/Sudeste (São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Vive em vários habitats, desde o cerrado, caatinga até florestas densas, como a Amazônica e Atlântica (WILSON; REEDER, 1992; GOHL; PARESQUE; FAGUNDES, 2005). A coloração do pêlo é variada: preto, acinzentado, amarelo escuro e amarelado (MOOJEN, 1952).

Necromys está estritamente relacionado com o gênero *Akodon*, levando-se em consideração a morfologia, eletroforese de enzimas e dados de DNA mitocondrial (REIG, 1987; SMITH; PATTON, 1991). Em estudos comparativos de braços cromossômicos homeólogos entre *Necromys lasiurus* (= *Bolomys lasiurus*) e *Akodon cursor* e *Akodon montensis*, utilizando bandeamento G e hibridação *in situ* com sondas teloméricas humanas, FAGUNDES; YONENAGA-YASSUDA (1998b), observaram segmentos teloméricos intersticiais em *Necromys*, que foram mantidos após eventos de fusão em tandem e cêntrica, inversão pericêntrica e perda de telômeros e centrômeros. Os autores também identificaram uma alta correspondência entre os braços cromossômicos destas três espécies, através de análise comparativa por bandamento GTG.

Tendo em vista esta grande homeologia cromossômica entre os dois gêneros, GEISE; CANAVEZ; SEUÁNEZ (1998) utilizaram *Necromys* (= *Bolomys*) como grupo comparativo, em um estudo filogenético a partir da análise dos braços cromossômicos em banda GTG de cinco espécies de *Akodon*. A topologia resultante da análise UPGMA de máxima parsimônia foi a seguinte: (*Necromys lasiurus* (*Akodon* sp. (*A. lindberghi* (*A. montensis* (*A. aff. cursor* (*A. cursor*)))))). Esta análise apontou também que *Necromys* é uma espécie realmente diferente de *Akodon* e evidenciou a direção de ocorrência de muitos dos rearranjos cromossômicos observados neste grupo.

Este gênero apresenta variação tanto no número de cromossomos, de 33 a 40, como no de braços dos cromossomos autossômicos (NA), de 34 a 40 (BIANCHI et al., 1971). A forma de $2n = 33$ em algumas populações de *N. lasiurus*, é resultante de uma fusão cêntrica entre dois cromossomos autossomos (MAIA; LANGUTTH, 1981; SVARTMAN; ALMEIDA, 1993).

GOHL; PARESQUE; FAGUNDES (2005), verificaram constância cariotípica, $2n=34/NA=34$ e um alto grau de polimorfismo de Ag-NORs em 18 exemplares de *N. lasiurus* de três localidades: Brasília, Mato Grosso e Tocantins. O resultado dos quatro tipos de marcações de Ag-NOR: telomérica no cromossomo grande (GTE), telomérica no cromossomo pequeno (PTE), centromérica no cromossomo grande (GCE) e centromérica no cromossomo pequeno (PCE), promoveram a separação dos indivíduos nas três populações estudadas, sendo a marcação GCE a principal discriminante.

1.4.4. O GÊNERO *Oxymycterus*

Ocorre em uma grande área na América do Sul, desde a Bolívia e Chile até a Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil. Mostra uma coloração que pode variar conforme a espécie com tonalizações avermelhadas, castanho-escuro, marrom escuro até o cinza escuro. A pelagem é longa e macia. Apresentam uma membrana interdigital bem marcada nos três dedos centrais das patas posteriores. Ocupam vários habitats entre eles, pântanos, pastagens, regiões semi-áridas e florestas (WILSON; REEDER, 1992). Seus hábitos são predominantemente fossoriais (MOOJEN, 1952).

O gênero compreende cerca de 10 espécies, onde o número diplóide é constante ($2n = 54$), variando somente quanto ao número de braços dos cromossomos autossômicos, de 60 a 64, devido à ocorrência do par 1 heteromórfico (KASAHARA; YONENAGA-YASSUDA, 1984).

SBALQUEIRO (1989), em estudos com 22 exemplares de *Oxymycterus* sp ($2n = 54$ e $NA = 64$) de três localidades (Taim (RS), Cambará do Sul (RS) e Roça Nova (PR)), observou uma variação na forma cromossômica do par 8 onde se evidencia um cromossomo metacêntrico, 8a, e um submetacêntrico, 8b. Também foi verificado um heteromorfismo tanto no tamanho como na localização das bandas C nos cromossomos do par 1, bem como um heteromorfismo de tamanho de banda C nos cromossomos do par 8, sendo que no cromossomo 8b a marcação é menor que a do cromossomo 8a.

BONVICINO; PENNA-FIRME; SEUÁNEZ (1998) discutem os achados cariotípicos em três espécies de *Oxymycterus* (*O. hispidus*, *O. caraparae* e *O. roberti*) onde verificaram uma constância tanto no $2n = 54$ como no $FN = 64$ e que são idênticos à descrição para outras espécies deste gênero (*O. angularis*, *O. rutilans*, *O. sp.*, *O. rufus*, *O. paramensis*, *O. nasutus* e *O. akodontius*). O complemento autossômico é composto por 6 pares de cromossomos biarmados ou não acrocêntricos (1 par submetacêntrico grande, 3 pares de metacêntricos médios, 2 pares de pequenos metacêntricos) e 20 pares de cromossomos acrocêntricos que variam gradualmente de tamanho, o cromossomo X é um submetacêntrico médio e o Y é o menor acrocêntrico.

1.4.5. O GÊNERO *Thaptomys*

Gênero representado por duas espécies, cuja espécie, *Thaptomys nigrita* Lichtenstein (1829) era considerada como sinonímia de *Akodon* (MUSSER; CARLETON, 1993). Apresentam uma ampla distribuição geográfica desde o Sudoeste do Brasil através do Estado da Bahia e Sul de Minas Gerais, compreendendo também os Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul até o Oeste do Paraguai e na Argentina na Província de Misiones. A pelagem é macia com coloração marrom, variando do chocolate ao leite até o castanho escuro, na região dorsal, e ventralmente mostra coloração alaranjada. O comprimento da cauda é aproximadamente igual à metade do tamanho do corpo, possui orelhas e olhos pequenos. Apresentam hábitos diurnos e certa agressividade, comumente encontrados sob troncos e raízes de árvores, às vezes em túneis feitos sob folhas ou terra fofa (HERSHKOVITZ, 1998).

Os exemplares estudados por YONENAGA (1975), KASAHARA; YONENAGA-YASSUDA (1984) e SBALQUEIRO (1989), apresentaram $2n$ e NA igual a 52. Porém GOMES, et al. (2005), analisou haplótipos de polimorfismo de fragmentos de restrição espécie-específicas em dois táxons do gênero *Thaptomys* com $2n = 52$ e $2n = 50$. Os indivíduos coletados em Una, na Bahia, apresentaram $2n = 50$ e quatro haplótipos exclusivos para a seqüência do gene citocromo b (1240pb), dentre os 40 fragmentos de restrição obtidos pela digestão com as enzimas de restrição (Hinfl, AluI, HaeIII, RsaI e MboI). Os demais exemplares de São Paulo, Espírito Santo e Rio

Grande do Sul, com $2n = 52$, apresentaram três haplótipos diferentes dos observados em indivíduos da Bahia, sugerindo uma diferenciação molecular entre as duas formas cariotípicas.

2. ALTERAÇÃO NA ESTRUTURA E NÚMERO DE CROMOSSOMOS

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A diversidade cariotípica em Mammalia é bem acentuada, principalmente em Rodentia, destacando-se a variação no número cromossômico desde 6 e 7 em *Muntiacus muntjak* (WURSTER; BENIRSCHKE, 1970), até 102 em *Tympanoctomys barrerae* (GALLARDO et al., 1999). As diferenças existentes entre os cariótipos de diferentes espécies e aquelas entre indivíduos de mesma espécie (polimorfismo cromossômico), são decorrentes de rearranjos cromossômicos que ocorreram em ancestrais comuns remotos ou mais recentes.

A especiação por alopatria, que implica em uma divergência gênica cumulativa decorrente de isolamento geográfico, seria o modo pelo qual as alterações genômicas se fixariam e dariam origem a novas espécies (MAYR, 1969, 1977).

WILSON et al. (1974), propõem que a evolução cromossômica e a evolução morfológica ocorrem paralelamente. WHITE (1978) acredita que os cromossomos podem ser úteis para remontar a história evolutiva de vários grupos, assim eles podem ter um importante papel na especiação de espécies crípticas de roedores. Outros autores, como REIG (1981) e KING (1993), sugerem que as mutações cromossômicas teriam uma importância no isolamento reprodutivo e portanto no processo de especiação.

KING (1993) considera que os principais rearranjos envolvidos nos processos de isolamento reprodutivo e, portanto, com consequências na especiação, seriam aqueles que provocam uma heterose potencialmente negativa - fusões em tandem, translocações e inversões, ao passo que adição ou deleção de heterocromatina constitutiva e os polimorfismos cromossômicos seriam considerados como mudanças adaptativas ou neutras sem quaisquer implicações neste processo. Segundo BAKER et al. (1987) o polimorfismo cromossômico poderia ser mantido em

uma população, pois em alguns casos a heterozigose aumentaria o valor adaptativo em comparação ao homozigoto.

NACHMAN; SEARLE (1995) em estudos com ratos domésticos, *Mus musculus*, da Europa revelaram que as variações cariotípicas são resultantes de fusões cêntricas ocorridas em um curto período de tempo, revelando uma rápida evolução do grupo. Os autores identificaram 89 diferentes combinações na formação de cromossomos metacêntricos a partir dos 20 pares cromossômicos acrocêntricos, forma cariotípica padrão desta espécie. Neste grupo estranhamente, as fusões que resultam em híbridos, quanto á forma cromossômica, são fixadas nas populações, e devem estar sofrendo influência da deriva, seleção e segregação meiótica, não contribuindo para o isolamento reprodutivo e permitindo a ocorrência do fluxo gênico.

RIESEBERG (2001) sugere que os rearranjos cromossômicos reduzem mais o fluxo gênico pela supressão da recombinação e aumento do efeito do isolamento dos genes ligados do que pela redução do valor adaptativo. Os rearranjos cromossômicos podem provocar diferentes efeitos no valor adaptativo, dependendo da espécie e tipo de rearranjos envolvidos. Nem sempre os rearranjos cromossômicos provocariam a redução da fertilidade, pois alguns mecanismos da meiose como a supressão parcial ou completa da recombinação, podem diminuir os problemas de segregação. Desta forma, as translocações e inversões produziriam um efeito negativo, enquanto que as adições e deleções de heterocromatina seriam consideradas neutras.

Para WHITE (1968) o polimorfismo cromossômico, surgido em uma população pequena e isolada, é resultante do cruzamento de um indivíduo alterado cromossomicamente com um indivíduo sem alteração. Este processo originará cariótipos originais, heterozigotos e homozigotos para a alteração, e caso o rearranjo esteja sendo fixado através do homozigoto, este irá gerar um mecanismo de isolamento genético que conduzirá à especiação.

Baseado no modelo acima, WILSON et al. (1975) e BUSH et al. (1977) sugerem que os roedores através da alta reprodutividade, baixa mobilidade e ocupação de nichos restritos seriam privilegiados por este processo.

Apesar disto AGUILERA (1980), propõe avaliar as correlações dos processos de evolução cromossômica e morfológica separadamente dos processos entre evolução cromossômica e especiação.

2.3. AS PRINCIPAIS ALTERAÇÕES NA ESTRUTURA DOS CROMOSSOMOS DE ROEDORES E SUAS IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS

Admitindo-se os cromossomos como tendo um papel significativo no processo de especiação, então e neste sentido, as alterações estruturais, como por exemplo, inversões e translocações (recíprocas, fusões-fissões cêntricas e fusões em tandem), estariam entre os mecanismos mais importantes neste processo.

INVERSÕES

Rearranjo cromossômico resultante de duas quebras que se unem ao restante do cromossomo de uma maneira invertida, que podem provocar a diminuição da fertilidade quando expressa em heterozigotos.

Em alguns grupos de roedores as inversões pericêntricas parecem ter tido importante papel no mecanismo de evolução cromossômica, como é o caso da espécie *Oryzomys albigularis*, estudada em bandeamento G, que apresenta $2n = 66$ e $NA = 86$ a 100 , onde foram observadas inversões em sete pares cromossômicos (AGUILERA; PEREZZAPATA; MARTINO, 1995).

Já na espécie *Akodon cursor*, inicialmente denominada *Akodon arviculoides* ssp. para a forma com $2n = 14$, foram detectados polimorfismos cromossômicos resultantes de inversões pericêntricas, sendo que nos oito exemplares estudados dois apresentaram inversão pericêntrica no par 3 (com um cromossomo metacêntrico e outro acrocêntrico). Outros dois exemplares apresentaram a mesma inversão e mais uma inversão no par 2. Os outros quatro exemplares não apresentaram pares heteromórficos, mas possuíam o par 3 acrocêntrico (em dois exemplares) e metacêntrico nos outros dois (YONENAGA, 1972). A autora sugere que esta variabilidade intraespecífica seja resultante do cruzamento de subespécies de *Akodon arviculoides* ssp. cariotipicamente diferentes.

Em um estudo de 97 exemplares de três citótipos de *Akodon cursor*, $2n = 14$, 15 e 16, coletados somente em uma localidade, Guaraqueçaba no Paraná, SBALQUEIRO; NASCIMENTO (1996) verificaram através de bandeamento GTG a

presença de 17 diferentes combinações cariotípicas e alterações no NA, pela presença de um rearranjo complexo do par 1 e inversões pericêntricas nos pares 2 e 3, que se apresentaram como acrocêntricos, heterozigotos e homozigotos submetacêntricos e metacêntricos, respectivamente. Eles verificaram que estas inversões nos pares 2 e 3 encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Também evidenciaram que indivíduos da forma $2n = 15$ são capazes de se reproduzir em condições de laboratório e que os filhotes apresentaram $2n = 14, 15$ e 16 , demonstrando que as inversões não estão interferindo na meiose destes indivíduos.

Posteriormente foram identificadas outras inversões pericêntricas em exemplares de *Akodon cursor* nos pares cromossômicos 1, 2, 3 e 5, além do rearranjo complexo do par 1, que envolve inversão pericêntrica e fissão ou fusão cêntrica (FAGUNDES; VIANNA-MORGANTE; YONENAGA-YASSUDA, 1997a).

GEISE; CANAVEZ; SEUÁNEZ (1998), estudando comparativamente cariótipos de *Akodon cursor* provenientes da Região Sudeste do Brasil verificaram que 39 espécimens de *Akodon cursor* com $2n = 14$, mostravam uma variação no NA, de 18 a 21 braços cromossômicos, decorrente de inversões pericêntricas nos pares cromossômicos 2 e 3, já evidenciados por SBALQUEIRO; NASCIMENTO (1996) para indivíduos da localidade de Guaraqueçaba no Litoral do Estado do Paraná.

Em um trabalho posterior de revisão e apresentação de novos dados FAGUNDES; CHRISTOFF; YONENAGA-YASSUDA (1998a) apontaram polimorfismos para a existência de 28 diferentes cariótipos de *Akodon cursor* em 311 indivíduos de diferentes populações da Floresta Atlântica do Brasil, de Pernambuco até o Paraná. Estes polimorfismos podem ser explicados pelos rearranjos complexos envolvendo inversões pericêntricas e fusões cêntricas nos cromossomos dos pares 1 e 3; inversões pericêntricas nos pares 2, 4 e 6; trissomia do par 7 e monossomia do X, sendo que o $2n$ variou de 14 a 16 e o NA de 18 a 26. Apesar de todo o polimorfismo cariotípico observado, os autores consideraram todos os exemplares pertencentes a uma única espécie, *Akodon cursor*.

Na descrição cariotípica de *Akodon cursor*, SILVA; YONENAGA-YASSUDA (1998) observaram um polimorfismo cromossômico, através do bandeamento G, em 29 exemplares, onde o NA variou de 14 a 16 devido a uma inversão pericêntrica no par cromossômico 3. Quando analisados com sondas de seqüências teloméricas

(TTAGGG)_n e FISH, estas revelaram marcações conspícuas na região pericentromérica do par 1, em 1p e em 3q, o que sugere que estas possam ser seqüências remanescentes de rearranjos cromossômicos.

BONVICINO; PENNA-FIRME; SEUÁNEZ (1998), analisando citogeneticamente nove exemplares de *Brucepattersonius griserufescens* (2n = NA = 52) da Região Sudeste do Brasil, observaram em dois exemplares a presença de uma inversão pericêntrica em um dos cromossomos do par 2, responsável pela alteração no NA para 53.

TRANSLOCAÇÕES

A translocação é a transferência de um segmento de um cromossomo para outro não-homólogo.

A ocorrência de permuta envolvendo cromossomos translocados pode formar gametas desequilibrados, com deleções e duplicações. Nestes casos, a meiose do heterozigoto apresenta a formação de agrupamentos em anéis e, dependendo da orientação do centrômero durante a anáfase I, poderá ou não provocar a diminuição da fertilidade do híbrido (WHITE, 1973).

A fusão em tandem, um tipo de translocação não recíproca, está diretamente relacionada na evolução cariotípica de várias espécies, como ocorre em *Nectomys squamipes*, cariótipo 2n=52 e 56, onde foram identificadas através de bandas C, G e R, duas fusões em tandem envolvendo quatro pares de autossomos (YONENAGA – YASSUDA et al., 1988; ZANCHIN, 1988).

A fusão cêntrica ou translocação Robertsoniana (descrita em cromossomos telocêntricos), proposta por ROBERTSON (1916), e a translocação não recíproca, se caracteriza pela união de dois cromossomos acrocêntricos formando um cromossomo de dois braços – metacêntrico, submetacêntrico ou subtelocêntrico. Na fissão cêntrica, um processo oposto, ocorre quebra de um cromossomo de dois braços, na região centromérica, originando dois cromossomos telocêntricos. Em ambos os casos ocorrem variações do número diplóide, sem alterar o número de braços.

Estes rearranjos podem interferir na fertilidade dos híbridos, pois gametas aneuplóides podem ser produzidos devido a problemas de segregação na meiose. A

presença ou não de gametas aneuplóides depende do tamanho relativo dos cromossomos envolvidos e do número e posição dos quiasmas (WHITE, 1973).

Segundo DUTRILLAUX (1988), as fusões/fissões cêntricas são predominantes entre os mamíferos, em especial nos Rodentia. Se observarmos as publicações dos últimos 15 anos, vários são os relatos indicando tais rearranjos como responsáveis pela variabilidade cariotípica evidenciada.

SBALQUEIRO; MATTEVI; OLIVEIRA (1984) descreveram a ocorrência de um mecanismo de determinação sexual do tipo $X_1 X_1 X_2 X_2 / X_1 X_2 Y$ em *Deltamys kempi*, decorrente de uma translocação Y-autossomo. Em uma fêmea com $2n = 37$, $NF = 38$, o bandamento G revelou que o cromossomo de dois braços era produto de uma fusão cêntrica entre os cromossomos acrocêntricos 1 e 13.

LIASCOVICH et al. (1990), relatam a ocorrência de fusões cêntricas na espécie *Akodon simulator simulator*, $2n = 38, 39, 40, 41$ e 42 , onde através de banda G foram identificadas três fusões cêntricas, exemplificando um novo polimorfismo robertsoniano.

GEISE; CANAVEZ; SEUÁNEZ (1998), ao analisarem, por meio de métodos filogenéticos, associados ao bandamento G, a proposição de parentesco entre cinco espécies de roedores do gênero *Akodon*, observaram uma diminuição no número de cromossomos devido a 11 fusões e uma inversão pericêntrica.

Já VIEIRA et al. (2004), através de estudos de localização de seqüências teloméricas – hibridação *in situ* – em cromossomo de três espécies de *Akodon* (*A. azarae*, *A. boliviensis* e *A. dolores*), observaram que *A. dolores* apresentava sinais de seqüências teloméricas próximas ao centrômero dos pares 4 e 5, o que sugere serem estas seqüências remanescentes de um processo de fusão cêntrica.

Também estudando espécies de Akodontinos FAGUNDES; YONENAGA-YASSUDA (1998b), com o emprego da hibridação *in situ* fluorescente com sondas de seqüência telomérica $(TTAGGG)_n$, evidenciaram a manutenção de seqüências teloméricas intersticiais em uma fusão cêntrica polimórfica na recente origem de *Necromys* (= *Bolomys*) *lasiurus*.

Estes autores sugerem ainda que na comparação dos cariótipos de *A. montensis* (AMO) e *N. lasiurus* (NLA) e de *A. montensis* e *A. cursor* (ACU), em banda G (dados de FAGUNDES et al., 1997b), é possível observar que as fusões

cêntricas são os mais freqüentes rearranjos para explicar a diferença cariotípica entre as três espécies. Rearranjos complexos, com inversões pericêntricas associadas a fusões cêntricas, foram descritos na análise comparativa entre AMO e ACU, no entanto, em relação a NLA e AMO, os rearranjos envolvidos seriam os de fusão cêntrica e em tandem.

VIEIRA et al. (2004) estudaram a distribuição da sequência telomérica de vertebrados, T₂AG₃, em três espécies de *Akodon* (*A. dolores*, *A. boliviensis* e *A. azarae*) da Argentina. Eles verificaram a discreta evidência de sinais de hibridação em domínios teloméricos de ambas as cromátides de todos os cromossomos e também em sítios não teloméricos. A espécie *A. dolores* apresentou polimorfismo devido a uma fusão Robertsoniana entre cromossomos dos pares 2 e 3, e sinais teloméricos em regiões centroméricas dos cromossomos dos pares 4 e 5. Os autores consideraram que a presença destes sinais teloméricos seriam seqüências remanescentes após o processo de fusão e que estas teriam sido perdidas durante a fusão dos cromossomos dos pares 2 e 3.

3. VARIAÇÕES CARIOTÍPICAS E SEU AUXÍLIO NA TAXONOMIA

Para se estabelecer às relações de afinidades filogenéticas, fundamentadas em dados citogenéticos, é comum utilizar-se das variações cromossômicas, intra e interespecíficas, ou mesmo a sua não ocorrência dentro das espécies de mamíferos.

Tais informações cariotípicas são utilizadas para determinar se as alterações são primitivas (plesiomórficas) ou derivadas (apomórficas), e mostram-se de grande importância na avaliação de afinidades evolutivas (GREENBAUM; BAKER, 1978). Sendo assim, a presença de um mesmo cromossomo ou de cariótipos derivados em diferentes espécies (sinapomorfia), é indicativo de ancestralidade comum entre os taxa e serve de base para a organização sistemática.

A análise cariotípica feita através do bandeamento cromossômico, segundo YATES et al. (1979) e QUMSIYEH; BAKER (1988), é útil na abordagem cladística, já que possibilita inferir os números e tipos de rearranjos do genoma que são ou não compartilhados pelas espécies, portanto é um estudo baseado em sinapomorfias.

Vários são os trabalhos relacionados à sistemática e evolução cromossômica, por meio do uso de técnicas de bandeamento, entre outras C e G, associadas a

cladística, como o verificado em roedores e outras ordens de mamíferos (THORPE et al., 1982; BAKER et al., 1983; KOOP et al., 1984; MODI, 1987; SBALQUEIRO, 1989 e DE OLIVEIRA, 1996).

4. CITOGENÉTICA MOLECULAR

4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os estudos de citogenética comparada tiveram um grande avanço com o desenvolvimento de técnicas de coloração diferenciada em cromossomos mitóticos e, principalmente, com o desenvolvimento da técnica de hibridação *in situ*. Já na década de 70, foram propostos mapas comparativos de cerca de 50 espécies diferentes de vertebrados, incluindo muitos mamíferos de importância econômica ou que servem como modelos biomédicos, através da utilização de metodologias que envolvem a hibridação *in situ* (CGOW, 1996).

Sondas cromossomo-específicas de uma espécie podem ser hibridadas *in situ* em metáfases de outra espécie, detectando homeologias cromossômicas, ou seja, revelando as seqüências conservadas dos genomas das duas espécies, esta variação da técnica de hibridação *in situ* é chamada de ZOO-FISH, inicialmente esta denominação foi utilizada para sondas cromossomo-específicas de humanos hibridadas em outros mamíferos. Muitas vezes a sonda pode hibridar em apenas um cromossomo, indicando que o cromossomo inteiro encontra-se conservado. Outras vezes, vários cromossomos ou segmentos de diferentes cromossomos são marcados, mostrando que rearranjos intercromossômicos ocorreram durante a divergência das espécies. A utilização da técnica de FISH reversa ou ZOO-FISH reversa, auxilia em uma identificação mais detalhada de homeologias entre diferentes espécies, ou seja, seqüências conservadas. Uma grande aplicação desta técnica é no estudo da evolução cariotípica, tanto para determinar mecanismos de mudanças cromossômicas ocorridas, no decorrer da história evolutiva do grupo, como na determinação das relações filogenéticas (FERGUSON-SMITH et al., 1998).

Para comparação de cariótipos de diferentes espécies, tendo como base a modificação ou manutenção de grupos sintênicos, são utilizadas sondas cromossomo-específicas. Um dos métodos baseia-se no uso de pinturas

cromossômicas (*Chromosome Paints*), que são misturas de sondas de DNA, usualmente derivadas de cromossomos separados por citometria de fluxo ou microdissecção e amplificadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (GRAY et al., 1979; LÜDECKE et al., 1989; WIENBERG; STANYON, 1998).

Recentemente foram desenvolvidos métodos moleculares mais específicos, que auxiliam a citogenética molecular no campo da evolução cromossômica, como:

1. a pintura cromossômica recíproca ou bidirecional (*Reciprocal Chromosome Painting*, ARNOLD et al., 1996; GOUREAU et al., 1996; WIENBERG et al., 1997), permite que sondas cromossomo-específicas de duas espécies sejam utilizadas de forma cruzada, sondas de uma espécie hibridadas em outra espécie e vice-versa, esta técnica permite determinar corretamente segmentos cromossômicos homeólogos entre as espécies envolvidas;
2. a pintura cromossômica reversa (*Reverse Chromosome Painting*, CARTER et al., 1992), permite identificar quais cromossomos de uma espécie “a” foram anteriormente hibridados por uma sonda espécie-específica da espécie “b”, através da utilização de sondas cromossomo-específicas da espécie “a” em “b” evidenciando assim as homeologias;
3. e a pintura cromossômica multidirecional (MÜLLER et al., 1997), permite que várias sondas cromossomo-específicas de mais de uma espécie sejam hibridadas em uma espécie alvo para a identificação de determinadas homeologias.
4. a hibridação genômica *in situ* – GISH (*Genomic In Situ Hybridization*, SCHWARZACHER et al., 1989), permite que o DNA genômico total de uma espécie seja hibridado em outra espécie, para identificar homeologias entre os cromossomos ou regiões cromossômicas das duas espécies.

As técnicas de pintura cromossômica recíproca e multidirecional, e hibridação *in situ* com sondas cromossomo-específicas estão bem estabelecidas para estudos entre humanos, primatas, carnívoros, cervídeos, artiodátilos e suídeos desde meados da década de 90 (CARTER et al., 1992; HAYES, 1995; RETTENBERGER et al., 1995; FRONICKE et al., 1996; ARNOLD et al., 1996; MÜLLER et al., 1997; HAMEISTER, et al., 1997). Porém, os estudos com sondas cromossomo-específicas em roedores somente tiveram início no final da década de 90, após a constatação de que as sondas humanas e de outros mamíferos, não apresentavam bons resultados

ao serem hibridadas em espécies de roedores (GUILLY et al., 1999; STANYON et al., 1999).

Sendo assim, estas técnicas constituem-se em um grande auxílio aos sistematas na formulação de hipóteses filogenéticas mais consistentes dos grupos que são investigados, contribuindo na elucidação de filogenias previamente apresentadas a partir de caracteres morfométricos, bioquímicos, cromossômicos em bandeamentos clássicos, seqüenciamento de genes, entre outros.

4.2. UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE FISH EM ESTUDOS EVOLUTIVOS E FILOGENÉTICOS

STANYON et al. (1999) propuseram a partir de estudos com pintura cromossômica recíproca, que os rearranjos genômicos entre rato (*Rattus norvegicus* - RNO) e camundongo (*Mus musculus* - MMU) ocorreram dez vezes mais rápido que entre humanos e gatos. Também neste estudo foi observada a ocorrência de 14 associações sintênicas em segmentos homeólogos em rato: MMU - 1/17 (por exemplo, hibridação das sondas cromossomo-específicas 1 e 17 de MMU em um cromossomo de RNO), -2/13, -3/15, -5/6, -5/11, -7/17, -7/19, -8/14, -10/15, -10/17, -11/16, -11/17, -13/15 e -12/17, que os autores propõem serem sentenias ancestrais para a Ordem Mammalia e que estas associações encontradas em camundongos sugerem que estes são formas evolutivas derivadas.

Em estudos com pintura cromossômica recíproca entre humanos e esquilos, a estrutura dos cromossomos desta espécie mostrou ser muito conservada. Foram observadas sentenias conservadas em 12 cromossomos humanos (HSA -5, -6, -9, -11, -13-15, -17, -18, -20, -21 e X) e, destas, seis são conhecidas e consideradas como pertencentes a associações no eutéria ancestral (3/21, 4/8, 7/16, 12/22, 14/15, 16/19). A partir destes resultados, STANYON et al. (2003) sugerem que poucas translocações derivadas caracterizaram a origem evolucionária dos roedores.

YANG et al. (2000), através do método de pintura cromossômica recíproca determinaram as homeologias cromossômicas entre o rato de laboratório e hamster chinês. A hibridação de sondas cromossomo-específicas de rato em hamster revelou que as sondas específicas para os cromossomos 3, 4, 9, 14, 18, 19 e X de rato

pintaram somente uma região cromossômica nos cromossomos de hamster. Assim, as 19 sondas autossômicas de rato identificaram 47 homeologias em regiões cromossômicas do genoma do hamster. Já a hibridação de 10 sondas autossômicas de hamster, em rato, produziram 38 homeologias autossômicas e confirmaram as homeologias cromossômicas entre as duas espécies.

STANYON et al. (2004) propõem que as sentenias cromossômicas: 1/17, 2/13, 7/19, 10/17, 11/16, 12/17 e 13/15 são associações ancestrais dos roedores a partir de hibridação de sondas cromossômicas de rato em *Apodemus sylvaticus*. Os autores observaram 38 segmentos conservados no cariótipo de *A. sylvaticus* e nove sentenias (cromossomos 3, 4, 7, 9, 14, 18, 19, X e Y) em relação ao cariótipo de rato.

Fundamentado na aplicação desta metodologia molecular em *A. cursor*, $2n = 14$ a 16, FAGUNDES et al. (1997b) propõem que o cariótipo com $2n = 14$ é o mais derivado. Neste mesmo sentido, associado às técnicas de hibridação *in situ* e bandeamento G, foi observada a quase completa correspondência entre os braços cromossômicos dos cariótipos de *Necromys* (= *Bolomys*) *lasiurus* ($2n = 33, 34$) e *Akodon montensis* ($2n = 24, 25$), onde apenas alguns segmentos dos cromossomos 6, 7 e B de *A. montensis* não apresentaram correspondência em *N. lasiurus*, o que sugere que ocorreu um acúmulo extra de cromatina na divergência de *A. montensis* (FAGUNDES; YONENAGA-YASSUDA, 1998b).

4.3. ESTUDO DA SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA

A idéia de classificar e agrupar os organismos remonta a antiguidade, onde os primeiros sistemas de classificação têm raízes na Grécia Antiga. No século XVIII, Linnaeus elabora um sistema consistente de classificação das espécies, sendo estas designadas por binomes latinos ou latinizados e agrupadas em classes, seguindo a lógica aristotélica (AMORIM, 1997).

Somente com a aceitação da teoria da evolução propostas por Darwin-Wallace, em 1859, é que ficou claro que as relações de parentesco entre as espécies fornecem um critério à classificação hierárquica, consistente e única dos organismos e que contemplam os eventos que ocorreram durante a história da vida no planeta.

Já o método de reconstrução das relações de parentesco entre grupos de organismos só foi proposto em 1950 por Willi Hennig e cuja escola foi chamada “Sistemática Filogenética” (AMORIM, 1997).

Assim, além de realizar o trabalho tradicional da taxonomia, a Sistemática Filogenética está associada a outras disciplinas como Zoologia, Botânica, Ecologia e Genética, fazendo parte da análise e interpretação dos padrões e processos evolutivos (MATIOLI, 2001).

A utilização da Sistemática Filogenética na genética teve início na década de 70 com o advento das técnicas de bandeamento cromossômico, principalmente as bandas: C, G, Q, R, Ag-NOR e incorporação de BrdU, onde a idéia era verificar as semelhanças e diferenças nas marcações cromossômicas nas espécies em estudo e inferir, a partir daí, o grau de parentesco entre elas. Neste caso a utilização de programas computacionais desenvolvidos especialmente para este fim foi de fundamental importância.

Desde então vários trabalhos vêm associando o estudo cromossômico com a filogenética. Destacando-se, entre outros, DE OLIVEIRA et al. (1999), que trabalhando com quatro espécies de *Alouatta* e banda Ag-NOR, obtiveram grande variedade de marcações dos sítios de NOR. O dendrograma obtido reforça a filogenia cromossômica proposta para o gênero, onde: *A. caraya* encontra-se na posição basal e *A. belzebul nigerrina* e *A. seniculus* formam um grupo mais relacionado.

Em estudos filogenéticos com roedores da Tribo Akodontini e emprego de banda G, SBALQUEIRO (1989) obteve um cladograma onde se verifica que *Oxymycterus* sp pode ser considerada como a espécie mais primitiva dos akodontinos, por compartilhar um maior número de caracteres com o grupo de fora ou grupo de comparação (*Oligoryzomys flavescens*). Já *Necromys lasiurus* ocupa uma posição intermediária entre *Oxymycterus* e as cinco espécies restantes. As quatro espécies de *Akodon* (*A. azarae*, *A. montensis*, *A. paranaensis* e *A. serrensis*) e mais *Deltamys kempfi* foram grupados em um único ramo, indicando derivação a partir de um clado ancestral comum.

HASS (1997), estudando cinco espécies de *Akodon*, com comparações cromossômicas em bandeamento G, análise através do método de parcimônia e utilizando o programa PAUP, observou a seguinte relação filogenética:

(*Oligoryzomys flavescens* (*T. nigrita* (*A. serrensis* (*A. paranaensis* (*A. montensis*, *A. cursor*))))). Foram detectadas sete apomorfias em *A. nigrita*, uma apomorfia em *A. serrensis* e *A. paranaensis* e cinco plesiomorfias e simplesiomorfias em relação ao grupo de fora.

Mais recentemente, foram associadas à Sistemática Filogenética as técnicas de hibridação *in situ* com fluorescência (FISH) ou a análise de DNA (segmentos e genes).

Assim, através da pintura cromossômica multicolor (hibridação *in situ* fluorescente – ZOO-FISH, onde várias sondas cromossomo-específicas de uma espécie são marcadas com haptenos diferentes, o que permite a utilização simultânea destas para a realização das hibridações em uma outra espécie), DE OLIVEIRA et al. (2002) reconstruiu a relação filogenética em espécies de macacos do gênero *Alouatta*. Esta análise indicou que o gênero forma um clado monofilético. A análise filogenética sugeriu que o gênero *Alouatta* pode estar dividido em dois grupos distintos: o primeiro inclui *A. caraya* e *A. belzebul*, e o segundo *A. s. macconnelli*, *A. sara*, *A. s. arctoidea* e *A. fusca*.

Por outro lado, MATSUBARA et al. (2004), utilizando sondas cromossômicas de rato e sondas de RNAr 5S e 18-28S em sete espécies de *Apodemus*, detectaram mudanças estruturais em nove pares de autossomos: 2, 10, 16, 17, 19, 20, 21, 22 e 23, na história evolutiva deste gênero. As variações no posicionamento dos genes de RNAr 18-28S foram localizados preferencialmente nos cromossomos 7, 8 e 12. Todas estas observações indicam que o cariótipo de *A. semotus* seria o mais conservado entre as sete espécies estudadas.

VIERA et al. (2004), em estudos de hibridação com seqüências teloméricas com três espécies de akodontinos: *Akodon dolores* (2n = 44-46), *A. boliviensis* (2n = 40) e *A. azarae* (2n = 38), propõem que a existência de sinais centroméricos em dois dos quatro pares de autossomos de dois braços de *A. dolores*, indica a retenção de pelo menos parte de seqüências teloméricas durante o processo de fusão. Também foram observados sinais próximos ao final do centrômero do par 1 autossômico de *A. boliviensis* e que é homólogo ao par 1 de *A. azarae*.

Independentemente ou associados à citogenética molecular, estudos com marcações genéticas têm sido amplamente utilizados em propostas filogenéticas. Desta forma, GEISE; SMITH; PATTON (2001), através da análise de seqüência de

DNA do gene do citocromo-*b*, propõem uma filogenia entre seis espécies de *Akodon* do sudeste do Brasil. A árvore de consenso revelou a separação entre *A. cursor* ($2n = 14, 15$) de *A. aff. cursor* ($2n = 16$). Verificou-se também a separação de outras quatro espécies de *Akodon* (*A. montensis*, *A. lindberghi*, *A. mystax* e *A. serrensis*) em um outro ramo da árvore de consenso.

HASS (2001) analisou através da técnica molecular RAPD seis espécies de *Akodon* (Rodentia, Muridae) ocorrentes na Região Sul do Brasil. O dendrograma resultante mostrou a formação de dois clados distintos: um deles envolvendo quatro das espécies (*A. nigrita* ($2n = 52$), *A. azarae* ($2n = 38$), *A. montensis* ($2n = 24$) e *A. serrensis* ($2n = 46$)), onde *A. azarae* e *A. nigrita* são as espécies mais similares (APD = 79,9); no segundo agrupamento estão unidos *A. cursor* ($2n = 14$) e *A. paranaensis* ($2n = 44$), cujo APD está entre 85 e 86.

5. OBJETIVOS

Como se nota, pela exposição no item anterior, vários métodos com enfoque genético, destacando-se as de marcadores e citogenética moleculares, foram adaptadas aos preceitos filogenéticos, em especial à citogenética molecular com o emprego da hibridação *in situ* com fluorescência (FISH), por extensão a FISH multicolor.

Como consequência, várias lacunas na história evolutiva dos roedores, em especial dos sigmodontinos sul-americanos, estão sendo objetos de estudos, muitas delas permanecendo ainda insolúveis, devido a enorme variabilidade cariotípica, decorrente de diferentes rearranjos estruturais, muitos deles extremamente complexos, o que sugere estar este grupo de animais ainda em pleno processo de especiação.

Desta forma, o presente trabalho objetivou fornecer subsídios à elucidação de problemas citotaxonômicos e evolutivos da Tribo Akodontini, ocorrentes, na Região Sul do Brasil, e, para tal, visou:

- 1 - Avaliar a aplicação da técnica de ZOO-FISH em roedores neotropicais, utilizando-se de sondas cromossomo-específicas de *Mus musculus* (rato de laboratório);
- 2 - Determinar as ocorrências de sintenias cromossômicas e associações sintênicas;
- 3 - Realizar o mapeamento cromossômico das espécies da Tribo Akodontini, através de FISH multicolorido;
- 4 - Analisar as relações filogenéticas entre as espécies estudadas neste trabalho, bem como, entre estas e as descritas na literatura, através da análise cladística.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS

1.1. Caracterização da amostra

A amostra foi constituída por, pelo menos, dois indivíduos de cada uma das oito espécies pertencentes a cinco gêneros de roedores da Tribo Akodontini: *Akodon*, *Brucepattersonius*, *Necomys*, *Oxymycterus* e *Thaptomys* (Tabela 1, parte dos exemplares do Anexo 1).

As coletas foram realizadas em diferentes localidades da Região Sul do Brasil, a partir de 2002, principalmente nos Estados do Paraná e de Santa Catarina, sendo que alguns dos exemplares, em especial de *Akodon* e *Necomys*, anteriores a esta data.

Na captura dos animais, foram utilizadas armadilhas de arame galvanizado do tipo “life trap” (17X9X10cm), com isca composta por rodela de milho verde ou mandioca com pasta de amendoim (Figura 1).

Após a captura, no momento de obtenção do material para análise, o animal foi sacrificado e identificado pela letra P (Paraná), seguida por um número. Este protocolo é adotado pelo Laboratório de Citogenética Animal do Departamento de Genética da UFPR. Os animais de outros Estados seguiram com a identificação original (Anexo 1 – Tombamento do Laboratório de Citogenética da UFPR, onde são mostrados dados referentes a cada um dos exemplares, incluindo o número de cromossomos).

Figura 1 – Exemplares de Akodontinos após captura em armadilha “life trap”, de arame galvanizado.



Foto: Ives José Sbalqueiro

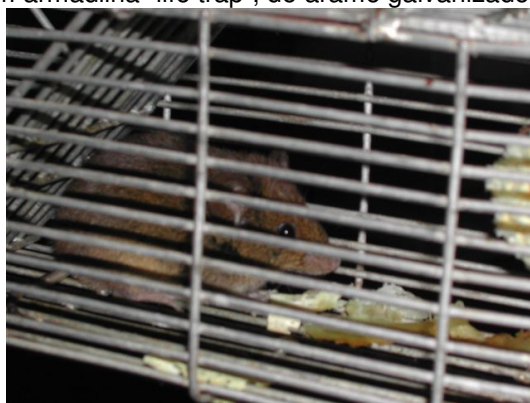


Foto: Iris Hass

Tabela 1 – Tabela dos exemplares utilizados neste trabalho com hibridação *in situ*, parte da tabela que se encontra no Anexo - 1

PROT	TAXA	SEXO	SIT	TOM	2n	LOCAL
P702*	<i>Akodon cursor</i>	F	PC	GEN	14	I. Laranjeiras – PR
P722*		M	-	GEN	16	I. Rasa – PR
P732*		F	PC	GEN	15	Ilhas das Gamelas - PR
P733*		M	PC	GEN	14	I. Rasa – PR
P738*		M	P	GEN	15	I. Gamelas PR
P765*		F	PC	GEN	16	Cria do Labor. Citog. Animal
P827*	<i>Akodon montensis</i>	M	PC	GEN	24	Quatro Barras – PR
P871*		F	-	GEN	24	PR
F725*		F	-	FURB	25	PN - Indaial – SC
P875*	<i>Akodon paranaensis</i>	F	PC	GEN	44	Três Barras do Paraná - PR
P890*		M	PC	GEN	44	Curitiba – PR
P851*	<i>Akodon serrensis</i>	F	C	GEN	46	Quatro Barras – PR
P854*		F	PC	GEN	46	Piraquara – PR
P856*		M	PC	GEN	46	Piraquara – PR
F6559*	<i>Thaptomys nigrita</i>	M	-	FURB	52	PN – Blumenau – SC
P889*		F	PC	GEN	52	Cria Labor, Piraquara – PR
P524*	<i>Necromys lasiurus</i>	F	-	MHCI	34	Jaguariaíva – PR
F6749*		M	-	FURB	34	São Domingos – SC
F6750*		F	-	FURB	34	São Domingos – SC
F6803*	<i>Oxymycterus sp.</i>	F	-	FURB	54	São Domingos – SC
F6851*		M	-	FURB	54	São Domingos – SC
F5089*	<i>Bucepattersonius griserufescens</i>	M	-	FURB	52	Itá – SC
F6872*		F	-	FURB	52	PN – Esp. Indaial – SC

2. MÉTODOS

2.1. Métodos citogenéticos

2.1.2. Preparação mitótica

A obtenção das metáfases seguiu a técnica preconizada por FORD; HAMERTON (1956), com modificações (SBALQUEIRO;NASCIMENTO, 1996); e constitui em: injetou-se, intraperitonealmente, 1ml de solução de colchicina a 0,1% para cada 100g de peso animal; após 1 hora o animal foi sacrificado e o material da medula óssea dos fêmures foi retirado e transferido diretamente à solução hipotônica (KCl, 0,075M); e decorrido 15 minutos a 37° C, submetido à fixação ácido-alcoólica (3 metanol: 1 ácido acético).

Após este procedimento os animais foram taxidermizados, catalogados e depositados, juntamente com seus crânios, no Departamento de Genética, e de Zoologia (Coleção Científica de Mastozoologia – DZUP) da Universidade Federal do Paraná, Museu de História do Capão da Imbuia e na Universidade Regional de Blumenau.

2.1.2. Preparação da lâmina

O material fixado foi pingado em lâminas previamente lavadas e secas ao ar. Posteriormente, as lâminas com material foram submetidas a diversos tipos de coloração da citogenética convencional (para a determinação dos cariótipos) e também para a técnica de hibridação com ZOO-FISH.

2.1.3. Bandeamento G

O bandeameto G foi utilizado nas comparações cromossômicas intra e interespecíficas, pois os cromossomos com este tipo de banda são considerados padrões nas comparações das hibridações.

Por motivos técnicos, as lâminas submetidas ao tratamento com tripsina não puderam ser utilizadas na técnica de FISH, pois como consequência da ação desta enzima a arquitetura cromossômica é destruída, o que impede o processo de hibridação com sondas de DNA, que exige a desnaturação e renaturação dos cromossomos.

O mesmo verificou-se com o corante Wright para obtenção de banda G, pois o padrão observado não foi satisfatório, sendo, então, também descartada esta técnica.

Desta forma utilizamos metáfases e cariótipos montados em bandamento GTG de cada espécie aqui estudada, que foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Ives José Sbalqueiro.

3. HIBRIDAÇÃO *IN SITU*

Para a hibridação *in situ* foram necessárias várias etapas (LEITCH et al., 1994; VERMA; BABU, 1995; GUERRA, 2004), desde: 1. seleção das melhores preparações citogenéticas; 2. a verificação da qualidade das metáfases a serem hibridadas; 3. passando pela preparação das sondas genômicas espécie-específicas de exemplares dos akodontinos; 4. seguido pela hibridação com sondas cromossomo-específicas de MMU; 5. até o processo de lavagem; 6. detecção dos sinais gerados; 7. captura das imagens e análise dos dados - segmentos hibridados – obtidos em cada espécie em questão.

3.1. Seleção dos protocolos com as melhores metáfases

De cada um dos protocolos do Anexo 1, foram montadas lâminas com o intuito de escolher os exemplares com as melhores preparações, ou seja, metáfases com número completo de cromossomos, bem espalhados e estendidos, e as preparações com pouco citoplasma, resultando na Tabela 1.

3.2. Hibridação espécie-específica dos exemplares de akodontinos

Para a preparação destas sondas foram necessárias várias etapas: 1. preparação das sondas genômicas espécie-específicas de cada representante dos Akodontinos (GISH); 2. auto-hibridação; 3. lavagem de alta estrigência; 4. detecção dos sinais gerados; 5. captura das imagens e análise dos dados.

3.2.1. Preparação de sondas genômicas de DNA (GISH) para testar a qualidade das metáfases (DNA) da amostra

Esta etapa tem como objetivo verificar a eficiência do DNA das metáfases dos indivíduos que serão hibridados com as sondas cromossomo-específicas de MMU. Aqui foram geradas sondas heterocromáticas individuais GISH (de cada exemplar estudado, Tabela 1) e auto-hibridadas.

A técnica GISH (*Genomic in situ hybridization*) é altamente empregada em citogenética vegetal, pois o DNA genômico total de uma espécie é marcado e usado para identificar os cromossomos desta espécie em uma outra reconhecendo os cromossomos ou segmentos homeólogos, esta técnica é muito utilizada na identificação de espécies vegetais híbridas. Porém, nós utilizamos o GISH para verificar a qualidade de hibridação das células dos indivíduos que formaram da nossa amostra.

Conforme a eficiência da hibridação com sua sonda genômica própria, verificamos a intensidade dos sinais gerados, e os exemplares que apresentaram os sinais de hibridação mais intensos, foram selecionados para prosseguir com as hibridações com sondas de MMU. Estas sondas são de DNA genômico e amplificadas com o iniciador 6MW (5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3') ou

F/S (iniciador semelhante ao 6MW, porém com diferentes bases nas posições N). Para a extração e marcação deste DNA foram utilizadas as metáfases de cada indivíduo, que estavam em fixador ácido-alcoólico.

Para tanto foi utilizada a técnica de amplificação de uma pequena quantidade de DNA genômico pela reação universal da cadeia da polimerase, DOP-PCR, descrita por TELENIUS et al. (1992) e SPEICHER et al. (1993). Aqui, esta técnica foi adaptada por nós, para a extração do DNA a partir do material celular fixado.

Para a reação de 1a. amplificação – DOP-PCR, as seguintes etapas foram obedecidas:

1. Foi deixado todo o material pré-autoclavado (tubo de microcentrífuga de 0,5 ml, ponteiras, água de PCR e papel toalha) por 30 min sob UV; 2. adicionou-se 50µl de suspensão celular em fixador ácido-alcoólico no tubo de microcentrífuga; 3. o material foi centrifugado por 20 min a 13.000 rpm; 4. retirado o sobrenadante com papel toalha, cuidado para que o material celular com metáfases - pellet - não seja removido; 5. acrescentado 25µl de água de PCR, (PCR Kit K 1220-02D – Invitrogen); 6. incubado em termo-agitador durante a noite a 37° C; 7. na sequência foi preparada a mistura de reação dos demais componentes da amplificação, seguindo a etapa 1. A mistura de reação deve ter um volume final de 25µl. Assim, foi dividido o volume da etapa 5 em dois tubos de microcentrífuga com 12,5µl cada e, depois, acrescentados mais 12,5µl da mistura de reação em cada um deles.

Demais reagentes da mistura de reação da 1a. amplificação e quantidade para

cada 25µl de reação:

- 5µl de 10Xtampão D; 2µl de dNTP MIX (dATP, dCTP, dTTP, dGTP – 2,5 mM de cada); 3,75µl de iniciador 6MW ou F/S; 1,25µl de 20XW1 detergente; 0,5µl de Taq Polimerase.

Após, os tubos foram submetidos à reação de PCR no termociclador conforme os passos abaixo:

PASSOS	TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
Desnaturação Inicial	94 °C	9 min	1
Desnaturação	94 °C	1 min	
Anelamento	30 °C	1:30 min	8
Extensão	72 °C	3 min	
Desnaturação	94 °C	1 min	
Anelamento	62 °C	1 min	25
Extensão	72 °C	1:30 min	
Extensão final	72 °C	8 min	1

3.2.2. Verificação dos fragmentos produzidos na DOP-PCR

Nesta etapa tomou-se 3µl da reação final da DOP-PCR, produtos da 1ª. amplificação, e misturou-se com 1µl de corante, aplicando-se em um gel de agarose 1% em TAE 1X. Aqui foi utilizado um marcador de pares de base – Hind III - para observar a obtenção de bandas de 550 a 2300 pares de bases. A corrida do gel se realiza a 130W/150mA por 20 min. A visualização das bandas no gel foi feita após coloração em brometo de etídio por 15 minutos, seguido de lavagem em água por 5 min. Depois o gel foi fotografado.

Foram considerados bons para a hibridação os produtos da DOP-PCR que apresentaram bandas entre 500 e 2300 pares de bases. Estes tamanhos de fragmento são apropriados para a realização de hibridação cromossômica.

OBS: o mesmo procedimento foi utilizado posteriormente para a verificação de fragmentos produzidos pela 2ª. amplificação (3.3.1.) e pela DOP-PCR de marcação (3.3.2.).

3.2.3. Preparação das sondas de DNA espécie-específicas marcadas com fluorocromos

As sondas cromossômicas espécie-específicas foram marcadas com biotina ou dinitrofenol e auto-hibridadas em cada indivíduo estudado (Tabela 2).

Tabela 2 - Característica dos dUTPs usados na marcação das sondas de DNA

dUTP	Sistema de detecção	Máxima emissão	Fluorescência (cor)
Biotina-dUTP	Avidina-Cy3	568 nm	Vermelho
Biotina-dUTP	Avidina-Cy5	672 nm	Infravermelho
Dinitrofenol-dUTP	AB-anti-din-FITC	520 nm	Verde
Dinitrofenol-dUTP	AB-anti-din-Cy5	672 nm	Infravermelho
Tamra	-----	580 nm	Vermelho

Reamplificação – 2^a DOP-PCR - marcação com fluorocromos

Nesta etapa foram reamplificados e marcados com fluorocromos os DNAs genômicos da 1^a. amplificação – DOP-PCR de cada espécie de Akodontino separadamente. Cada sonda de DNA genômico foi amplificada em um volume final de 25µl.

Reagentes da 2^a. DOP-PCR:

- 1µl de DNA cromossômico (100ng do produto da 1^a. amplificação); 2,5µl de 10Xtampão para PCR; 1,5µl de dNTP MIX; 1µl de Biotina-dUTP ou Dinitrofenol-dUTP; 2,5µl de iniciador 6MW ou F/S; 1,25µl de 20XW1 detergente, 0,3µl a 0,5µl de Taq Polimerase; 14,75µl de água ultrapura.

Procedimento:

1. Os reagentes foram adicionados em um tubo de microcentrífuga de 1,5µl (sem o DNA cromossômico); agitados em Vórtex e centrifugados rapidamente - resultou na mistura de reação mãe; 2. foram colocados 24µl da mistura de reação mãe em tubos de microcentrífuga de 0,5µl, depois acrescido 1µl a 1,5µl de DNA genômico; agitados em Vórtex e centrifugados rapidamente; 3. após, os tubos foram submetidos à reação de PCR no termociclador, seguindo os passos:

PASSOS	TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
Desnaturação Inicial	94 °C	3 min	1
Desnaturação	94 °C	1 min	30
Anelamento	62 °C	1 min	
Extensão	72 °C	1:30 min	
Extensão final	72 °C	8 min	1

Na seqüência, o procedimento de verificação do tamanho dos fragmentos das sondas conforme a etapa 3.2.2.

3.2.4. Preparação das sondas para hibridação:

Após a marcação das sondas espécie-específicas, estas são preparadas para comporem a solução de hibridação, conforme o procedimento abaixo:

1. Misturou-se em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml a sonda espécie-específica, no volume 22µl; 2. acrescentou-se 0,1 de volume de acetato de sódio 3M; 2,5 de volume de etanol gelado; 5µl de Maus Cot -1DNA; 3µl de DNA de esperma de salmão; 3. agitou-se em vórtex e centrifugou-se rapidamente; 4. deixou-se em freezer -20°C por 30 min; 5. centrifugou-se a 13.000rpm por 18 min; 6. removeu-se o sobrenadante e secou-se o material em estufa a 60°C por 1 min; 7. adicionou-se 10µl de tampão de hibridação e deixou-se no termo-agitador a 37°C por pelo menos uma hora para que o material ficasse homogeneamente misturado, de preferência por 12 horas.

Nesta etapa a presença de Maus Cot-1, que é um DNA competidor não marcado, serve para realizar a supressão cromossômica *in situ*. Assim, as seqüências repetitivas encontradas no genoma: DNA satélite, SINES e LINES são hibridadas logo após a desnaturação já que possuem uma cinética de reassociação diferenciada do restante do DNA do genoma.

A adição de DNA de esperma de salmão serve como inibidor da marcação de fundo, pois minimiza a ocorrência de hibridação cruzada gerando um aumento da especificidade dos sinais de hibridação.

3.2.5. Montagem das lâminas para hibridação

Esta etapa é importante para a preparação dos cromossomos para o recebimento do material celular, e consiste das seguintes procedimentos:

1. Incubou-se as lâminas de vidro (76X26mm) em etanol/éter na proporção 1:1 por 3 min;

2. Secou-se as lâminas com papel toalha, identificando-as devidamente;

3. Colocou-se as lâminas dentro de uma caixa de metal, incubando-as dentro do banho-maria a 55°C por 1 min, para que se formasse um filme de vapor d'água, pingando-se uma ou duas gotas da suspensão celular em cada lâmina, dependendo do tipo de hibridação espécie-específica e GISH, respectivamente. Em seguida gotejou-se, sobre o material uma gota de solução ácido-alcoólica, para melhor separar os cromossomos nas metáfases;

4. Deixou-se a lâmina no banho-maria por mais ou menos 1 min para secar bem;
5. Observou-se as lâminas ao microscópio invertido para verificar a quantidade de citoplasma nas metáfases;
6. Dependendo da quantidade de citoplasma, deixou-se as lâminas de 50 segundos a 40 min em Pepsina (99ml de água, 1 ml de HCl 1N e 50 μ l de Pepsina 10%), no banho-maria, a 37 °C;
7. Incubou-se as lâminas em 1XPBS, temperatura ambiente, por 5 min;
8. Repetiu-se o passo 7 por mais duas vezes;
9. Incubou-se as lâminas em álcool 70%, 90% e 100% por 3 min cada;
10. Secaram-se as lâminas por 1 h a 60 °C ou durante a noite a 37 °C.

3.2.6. Desnaturação das sondas de DNA marcadas

Seguiram-se as etapas:

1. Retiraram-se os tubos de microcentrífuga com as sondas do termo-agitador, Etapa 3.2.4., e foram colocados em banho-maria a 70 ou 72 °C por 7 min para denaturar;
2. Incubaram-se as sondas em banho-maria a 37 °C por 30 a 50 min, para a reassociação das seqüências repetitivas de DNA, no caso de Maus Cot-1.

3.2.7. Preparação das lâminas montadas para a hibridação

Foram efetuados os seguintes procedimentos:

1. Colocaram-se as lâminas preparadas nas etapas 3.2.5 e 3.2.6 em solução de formamida 70% (70ml de formamida P.A., 30 ml de 2XSSC e pH= 7,0) a 72 °C por 1:30 min;
2. Incubou-se em etanol 70%, 90%, gelados, e etanol 100%, temperatura ambiente, por 3 min cada;

3. Deixou-se escorrer o excesso de etanol 100% para que a lâmina secasse rapidamente.

3.2.8. Hibridação

Para esta etapa foram necessários os seguintes procedimentos:

1. Pingou-se sobre uma das áreas dos exemplares celulares, as sondas de DNA marcadas e denaturadas;
2. Repetiu-se o passo 1 para a outra área de células, caso seja realizada outra hibridação simultânea;
3. Cobriu-se cada área com uma lamínula de 20x20mm;
4. Fixou-se as bordas da lamínula com um selante;
5. Corou-se as lâminas montadas em uma caixa de metal, para que ficassem fora da ação da luz e levou-se ao banho-maria a 37 °C, por 24 h, para que ocorresse a hibridação.

3.2.9. Lavagens pós-hibridação

Estas lavagens têm como objetivo eliminar a marcação de fundo das hibridações devido a ocorrência de hibridação não específica.

Procedimentos:

1. Retirou-se o selante e as lamínulas da lâmina com auxílio de uma pinça;
2. Incubou-se as lâminas em solução 2xSSC a temperatura ambiente por 1 min;
3. Procedeu-se com a lavagem das lâminas com alta estringência, no caso das hibridações com a mesma espécie ou espécies relacionadas;
4. Incubou-se as lâminas em solução de 0,1XSSC a 62 °C por 5 min;
5. Repetiu-se por mais duas vezes o passo 4;
6. Incubou-se as lâminas em 2xSSC por 1 min.

3.2.10. Detecção dos sinais de hibridação

Os sistemas de marcação e detecção empregados foram escolhidos de acordo com o tipo de experimento executado. No caso de hibridações utilizando mais de uma cor, atentou-se às possibilidades de otimização da combinação da molécula-repórter (hapteno) e o sistema de detecção usado, para se obter uma boa distribuição da intensidade do sinal (Tabela 2).

Procedimentos:

1. Incubou-se as lâminas por 1 min em 4xSSC/0,2% Tween a temperatura ambiente para equilibrar o pH;
2. Colocou-se as lâminas em uma caixa de metal e cobriu-as com 1 ml de solução de BSA 3% em 4xSSC/0,2% Tween e incubou-se em banho-maria a 37 °C por 20 min;
3. Preparou-se a solução de detecção de dinitrofenol, anticorpo Rabbit α -Dinitrofenol 1:200 em BSA 1% em 4xSSC/0,2% Tween;
4. Passou-se a lâmina rapidamente em solução de 4xSSC/0,2% Tween, a temperatura ambiente;
5. Pegou-se um lamínula de 24x60mm, colocou-se sobre a bancada e gotejou-se sobre ela 150 μ l da solução da etapa 3;
6. Emborcou-se a lâmina sobre a lamínula que está na bancada;
7. Incubou-se as lâminas contidas em uma caixa de metal, em banho-maria, a 37 °C, por 45 min;
8. Retirou-se as lamínulas e incubou-se por três vezes em 4xSSC/0,2% Tween, a 45 °C, por 5 min cada. De preferência deixou-se o banho-maria tampado com uma tampa de metal para minimizar o tempo de exposição das lâminas à luz;
9. Preparou-se a solução de detecção de dinitrofenol e biotina, anticorpo Goat α Rabbit-Alexa 488 1:200 para dinitrofenol e Avidin Cy3 1:500 para biotina em BSA 1% em 4xSSC/0,2% Tween;
10. Repetiram-se as etapas de 5 a 8.

OBS: No caso de hibridações marcadas somente com biotina seguiram-se os seguintes passos e ordem: 1, 2, 9 (Preparar a solução de detecção biotina, anticorpo Avidin Cy3 1:500 em BSA 1% em 4xSSC/0,2% Tween), 5, 6, 7 e 8. Na Tabela 3, encontram-se as concentrações de uso dos anticorpos.

Tabela 3 – Concentração do conjugado anticorpo para a solução uso

AVIDINA-FLUOROCROMO/ANTICORPO	CONCENTRAÇÃO EM 4XSSC/0,2%TWEEN/1% BSA
Avidina-Cy3	1:500
Avidina-Cy5	1:100
Anti-Dinitrofenol-Cy3	1:500
Anti-Dinitrofenol-Cy5	1:100
Anti-Dinitrofenol-FITC	1:100
Dinitrofenol- Goat α Rabbit-Alexa 488	1:200
Dinitrofenol-Rabbit α	1:200

3.2.11. Coloração com Actinomicina D/DAPI

O corante fluorescente DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenil-indol) tem afinidade pelas seqüências de DNA ricas em A-T, o que resulta em um padrão de bandas semelhante àquele produzido por bandeamento R. Este pode ser intensificado quando incubado com Actinomicina D que tem afinidade pelas seqüências de DNA ricas em G-C e que não é fluorescente, permitindo assim, que os cromossomos sejam identificados, através de um padrão de banda tipo G.

Preparo das soluções:

1. Actinomicina D – solução estoque: 0,5 mg/ml 50%etanol/50%1xPBS, e solução uso: 1:150 em 1xPBS;
2. DAPI – solução estoque: 1mg/5ml de 2xSSC, e solução uso: 300 μ l de solução estoque em 90ml de 4xSSC/1% Tween.

Procedimento da coloração:

1. Após a detecção dos sinais de hibridação foram colocados, sobre cada lâmina, 150 μ l de solução uso de Actinomicina D e uma lamínula (24x60mm), essa foi acondicionada em uma caixa plástica preta e mantidas à temperatura ambiente por 20 à 25 min;
2. Retirou-se a lamínula e incubou-se em 4xSSC/1% Tween por 1 min;

3. Incubou-se em solução uso de DAPI, em banho-maria, a 37 °C por 5 à 7 min;
4. Incubou-se em 4xSSC/1% Tween por 1 min;
5. Deixou-se escorrer o excesso de solução e colocou-se em uma lamínula de 24x60mm duas gotas de anti-fading, para conservar a intensidade dos sinais fluorescentes;
6. Emborcou-se as lâminas sobre as lamínulas, e observou-se as preparações ao micoroscópio.

3.3. Hibridação com as sondas cromossomo-específicas de *Mus musculus*

Para a hibridação *in situ* com sondas cromossomo-específicas, foram necessárias várias etapas, desde: 1. a preparação de cada uma das sondas cromossomo-específicas; 2. seguido o processo de lavagem; 3. detecção dos sinais gerados e 4. captura das imagens e análise dos dados - segmentos hibridados – obtidos em cada espécie em questão.

Linhagens celulares de laboratório da espécie *Mus musculus* (MMU) foram utilizadas para controle das hibridações, as metáfases serviram para verificar a qualidade das sondas cromossômicas que iriam ser utilizadas para hibridar as metáfases da amostra de roedores akodontinos.

As sondas cromossomo-específicas de DNA de *Mus musculus* (MMU), rato de laboratório, foram fornecidas pelo Institut für Anthropologie und Humangenetik (LMU), da Alemanha. O material cromossômico destas espécies foi isolado por FACS ("Fluorescence Activated Chromosome Sorting"), conforme GRAY et al. (1979) e YOUNG et al. (1981). Este processo consiste na marcação dos cromossomos com corantes fluorescentes como : *Hoechst 33258*, DAPI ou iodeto de propídeo, assim quando uma gota contendo um cromossomo atravessa um feixe de raios laser, o cromossomo emite fluorescência, sendo esta quantidade medida por um detector. Já que a quantidade de fluorocromo ligado ao cromossomo é proporcional à quantidade de DNA, os cromossomos podem ser distinguidos e separados conforme a emissão de fluorescência.

Caso os cromossomos de um determinado genótipo, como é o caso de MMU, apresentem tamanhos muito semelhantes, ou seja com quantidades de DNA parecidos, a separação dos mesmos poderá ser efetuada levando-se em conta a proporção de AT:GC. Assim é utilizada uma dupla coloração com fluorocromos, por exemplo: DAPI ou *Hoechst 33258* que têm afinidade por AT e cromomicina A3 com maior afinidade por GC. Como estes fluorocromos emitem luz com comprimentos de ondas diferentes o citômetro de fluxo pode separar os cromossomos mesmo que possuam tamanhos similares.

Quando um determinado número de cromossomos iguais são isolados, a sequência de seu DNA deve ser amplificada para produzir uma quantidade suficiente para as futuras hibridações e estoque. Assim estas seqüências são separadas por eletroforese, isoladas e testadas como sondas para HIS, sendo as que satisfatoriamente hibridizarem utilizadas para compor a sonda cromossômica.

A partir daí, a preparação das sondas dá-se através da amplificação e marcação pela reação de cadeia da polimerase usando-se um iniciador degenerado (DOP-PCR), que utiliza iniciadores de síntese com seqüências muito variadas e que se ligam a um grande número de sítios, amplificando o DNA fornecido como molde.

Também é necessário estar atento ao tamanho dos segmentos que irão compor as sondas, sendo o tamanho ideal entre 500 e 2300 pb. As seqüências pequenas podem hibridar em seqüências não-alvo, mas que podem ser casualmente complementares, proporcionando a hibridação cruzada. Já as seqüências muito longas podem apresentar dificuldade para acessar o cromossomo alvo, - ou porque apresentam frequentemente pequenas seqüências de DNA repetitivo, ou por serem responsáveis por pareamentos fora do DNA-alvo. Para isso a hibridação deve ocorrer na presença de DNA bloqueador ou supressor.

3.3.1. Preparação das Sondas de DNA cromossomo-específicas

Foram utilizadas sondas de DNA de *Mus musculus* (MMU), rato de laboratório, cromossomo-específicas, fornecidas pelo Institut für Anthropologie und Humangenetik (LMU), da Alemanha.

Reamplificação – 2^a. DOP-PCR

Nesta etapa foram reamplificadas sondas dos cromossomos de *Mus musculus* separadamente. Cada sonda cromossômica foi amplificada em um volume final de 25µl.

Reagentes da 2^a. DOP-PCR:

- 1µl de DNA cromossômico (100ng do produto da 1^a. amplificação – Ver Observação no final deste item); 2,5µl de 10Xtampão para PCR ; 1,5µl de dNTP MIX; 2,5µl de 6MW ou F/S iniciador; 1,25µl de 20XW1 detergente; 0,3µl a 0,5µl de Taq Polimerase; 15,75µl de água ultrapura.

Procedimento:

1. Os reagentes foram adicionados em um tubo de microcentrífuga de 1,5µl (sem o DNA cromossômico), agitadas em Vórtex e centrifugadas rapidamente, resultando na mistura de reação mãe; 2. Foram colocados 24µl da mistura de reação mãe em tubos de microcentrífuga de 0,5µl e depois acrescidos 1µl a 1,5µl de DNA cromossômico, agitadas em Vórtex e centrifugadas rapidamente; 3. Após, os tubos foram submetidos à reação de PCR, no termociclador, seguindo os passos descritos na etapa 3.2.3.

Obs: a primeira amplificação ou 1^a. DOP-PCR, foi realizada previamente em outro laboratório, onde as 21 sondas cromossômicas foram produzidas – 19 sondas de cromossomos autossômicos e mais as sondas dos cromossomos sexuais, X e Y.

3.3.2. Marcação por amplificação dos fragmentos de cromossomos – DOP-PCR

Para visualizar-se o DNA alvo ao microscópio é necessário que as sondas para a hibridação estejam marcadas com haptenos ou fluorocromos. As sondas são marcadas com moléculas específicas que são desoxiuraciltrofosfatos (d-UTPs) modificados e incorporados ao DNA, substituindo o desoxitimidiltrifosfato (dTTP) durante a reação de PCR. Foi utilizado tanto o dUTP ligado a fluorocromo (Tamra-dUTP) de visualização direta, como os ligados a haptenos (Biotina-dUTP e Dinitrofenos-dUTP) de visualização indireta e que necessitam de anticorpos ligados a fluorocromos para serem visualizados.

Cada sonda cromossomo-específica marcada com fluorocromo ou hapteno é amplificada em um volume final de 25µl. Para as hibridações entre *Mus musculus* e demais espécies de akodontinos, cada sonda cromossômica foi amplificada duas vezes, ou seja, foram realizadas duas DOP-PCR com volume final de 25µl para cada com seu respectivo fluorocromo ou hapteno.

Reagentes da DOP-PCR para marcação com fluorocromos ou haptenos:

- 1µl do produto da reamplificação da 2a. DOP-PCR; 2,5µl de 10Xtampão para PCR; 1,5µl de dNTP MIX; 1µl de Biotina-dUTP, Dinitrofenol-dUTP ou Tamra-dUTP; 2,5µl de 6MW ou F/S iniciador; 1,25µl de 20XW1 detergente; 0,5µl de Taq Polimerase; 14,75µl de água ultrapura.

Procedimento:

1. Os reagentes são adicionados em um tubo de microcentrífuga de 1,5µl , exceto o DNA, agitadas em Vórtex e centrifugadas rapidamente, resultando no Master Mix para cada dUTP;

2. Foram colocados 24µl da mistura de reação mãe em tubos de microcentrífuga de 0,5µl e depois acrescido 1µl do produto da reamplificação da 2a. DOP-PCR e, após, agitadas em Vórtex e centrifugadas rapidamente;

3. Na seqüência, os tubos foram submetidos à reação de PCR no termociclador seguindo as etapas relacionadas no item 3.2.3.

Após esta etapa procedeu-se conforme o item 3.2.2.

3.3.3. Preparação dos SETs para hibridação

Após a marcação das sondas cromossomo-específicas, estas foram misturadas conforme a tabelas 4 e 5 para a obtenção dos diferentes SETs de hibridação. Estes SETs foram utilizados para elaborar a solução de hibridação e que são compostos pelas sondas cromossomo-específicas de MMU marcadas com diferentes haptenos, acrescidos de outros componentes fundamentais para a formulação da solução final de hibridação.

Procedimento:

1. Misturou-se em um tubo de microcentrífuga as sondas cromossomo-específicas componentes de cada SET (com duas ou três cores), por exemplo, SET-M1: misturou-se os dois produtos da DOP-PCR de marcação, ou seja, duas vezes 25µl das sondas cromossomos-específicas: 1 e 2 (Tabela 4), ou três produtos de DOP-PCR com marcações: 1, 2 e 3 (Tabela 5);
2. Acrescentaram-se na seqüência, 0,1 de volume de acetato de sódio 3M; 2,5 de volume de etanol gelado; 5µl de Maus Cot-1DNA; 3µl de DNA de esperma de salmão;
3. Agitou-se em Vórtex, centrifugou-se rapidamente, deixando-se em freezer – 20°C por 30 min;
4. Centrifugou-se a 13.000rpm por 18 min, removendo-se o sobrenadante e secar o material em estufa a 60°C por 1 min, adicionou-se, então, 10µl de tampão de hibridação e deixou-se no termo-agitador a 37°C, por pelo menos uma hora (ideal por 12 horas) para que o material ficasse homogeneamente misturado.

Tabela 4 - Número do cromossomo de MMU (nas colunas dos haptenos), com as respectivas marcações dos SETs

BIOTINA (vermelho)	DINITROFENOL (verde)	SET
1	2	M1
3	4	M2
5	6	M3
7	8	M4
9	10	M5
11	12	M6
13	14	M7
15	16	M8
17	18	M9
19	X	M10

Tabela 5 - Número dos cromossomos de MMU (nas colunas dos haptenos e o fluorocromo tamra) com as respectivas marcações dos SETs

BIOTINA (azul)	DINITROFENOL (verde)	TAMRA (vermelho)	SET
1	2	3	M1
4	5	6	M2
7	8	9	M3
10	11	12	M4
13	14	15	M5
16	17	18	M6
19	X	Y	M7

3.3.4. Montagem das lâminas para hibridação

Os procedimentos seguem as etapas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, conforme o item 3.2.5., exceto a etapa 3, conforme abaixo:

As lâminas foram colocadas dentro de uma caixa de metal incubando-as em banho-maria, a 55°C, por 1 min, para que se formasse um filme de vapor d'água e, então, pingou-se duas gotas da suspensão celular em cada uma delas. Atentou-se para que as gotas estivessem separadas, em áreas distintas, para a realização de hibridação simultânea com SETs diferentes. Em seguida colocou-se sobre o material uma gota de solução ácido-alcoólica, para melhor separar os cromossomos nas metáfases.

3.3.5. Denatura  o das sondas de DNA marcadas

Seguiu-se conforme preconizado no item 3.2.6.

3.3.6. Prepar  o das lâminas montadas para a hibrida  o

Procedeu-se conforme o item 3.2.7., exceto o passo 3., onde deixou-se as lâminas secando enquanto aguardava-se o tempo de desnatura  o das sondas cromossomo-espec  ficas marcadas.

3.3.7. Hibrida  o

Procedimentos:

1. Pingou-se sobre uma das duas   reas da lâmina montada (passo 3, item 3.3.4), as sondas de DNA marcadas e denaturadas;
2. Repetiu-se o passo 1 para a outra   rea, com outro SET de hibrida  o; cobrindo-se, ent  o, cada uma delas com uma lam  nula de 20x20mm;
3. Fixaram-se as bordas das lam  nulas com um selante, colocando-se as lâminas montadas em uma caixa de metal, para evitar a a  o da luz, deixando-as em banho-maria, a 37   C, por 48-72 h, para que ocorra a hibrida  o.

3.3.8. Lavagens p  s-hibrida  o

Estas lavagens t  m como objetivo eliminar as marca  es de fundo devido a ocorr  ncia de hibrida  o n  o espec  fica.

Procedimentos:

1. Retirou-se o selante e as lam  nulas da lâmina com aux  lio de uma pin  a;
2. Incubou-se as lâminas em solu  o 2xSSC, a temperatura ambiente, por 1 min;
3. Procedeu-se com a lavagem das lâminas com estring  ncia moderada, no caso das hibrida  es com esp  cies distintas;
4. Incubou-se as lâminas em solu  o de 50% formamida (50ml de formamida P.A., 50 ml de 2XSSC e pH= 7,0), a 37   C, por 5 min, duas vezes;
5. Incubou-se as lâminas em 2xSSC, por 5 min, duas vezes;

3.3.9. Detec  o dos sinais de hibrida  o

Os sistemas de marca  o e detec  o empregados foram escolhidos de acordo com o tipo de experimento executado (simples ou multicor). No caso de hibrida  es utilizando mais de uma cor, atentou-se   s possibilidades de otimiza  o da combina  o da mol  cula-rep  rter (hapteno) e o sistema de detec  o usado, para se obter uma boa distribui  o da intensidade do sinal.

Procedimentos:

1. Incubou-se as lâminas por 1 min em 4xSSC/0,2% Tween a temperatura ambiente, para equilibrar o pH;
2. Colocou-se as lâminas em uma caixa de metal, cobrindo-as com 1 ml de solução de BSA 3% em 4xSSC/0,2% Tween e, então, incubou-se em banho-maria, á 37°C, por 20 min;
3. Preparou-se a solução de detecção de dinitrofenol, anticorpo Rabbit α -Dinitrofenol 1:200 em BSA 1% em 4xSSC/0,2% Tween;
4. Passou-se a lâmina rapidamente em solução de 4xSSC/0,2% Tween a temperatura ambiente;
5. Sobre uma lamínula (24x60mm), colocada em uma bancada, colocou-se 150 μ l da solução da etapa 3 e emborcou-se sobre esta a lâmina com o material hibridado;
6. Incubou-se as lâminas, mantidas em uma caixa de metal, a 37°C por, 45 min;
7. Retirou-se as lamínulas e incubou-se por três vezes, em 4xSSC/0,2% Tween, a 45°C, por 5 min cada. De preferência deixou-se o banho-maria com uma tampa de metal para minimizar o tempo de exposição das lâminas à ação da luz;
8. Preparou-se a solução de detecção de dinitrofenol e biotina, anticorpo Goat α Rabbit-Alexa 488 1:200 para dinitrofenol e Avidina Cy3 1:500 para biotina em BSA 1% em 4xSSC/0,2% Tween;
9. Repetiu-se as etapas de 5 a 7.

3.3.10. Coloração com Actinomicina D/DAPI

Esta etapa seguiu-se os passos conforme o item 3.2.11.

3.3.11. Hibridação sequencial

Também no decorrer dos trabalhos houve a realização de algumas hibridações de forma seqüencial, ou seja, a mesma lâmina foi submetida a mais de um processo de hibridação, envolvendo sondas distintas, utilizando-se a técnica de hibridação seqüencial proposta por MÜLLER et al. (2002). A hibridação seqüencial foi utilizada em preparações que apresentavam ótimas metáfases ou quando o material a ser hibridado era escasso.

3.4. Análises

3.4.1. Ao microscópio

O microscópio utilizado, na Alemanha, foi um Zeiss-Axiophot acoplado a um sistema de fluorescência com uma lâmpada de mercúrio HBO 100. Na documentação digital foram utilizadas as objetivas de 63x ou de 100x (Planapochromat). No Brasil, utilizou-se o microscópio também Zeiss-Axiophot acoplado a um sistema de fluorescência com uma lâmpada de mercúrio HBO 100. Na documentação digital foi utilizada a objetiva de 63x (Planapochromat).

A detecção dos sinais produzidos por Rabbit α -Dinitrofenol, Tamra e Cy5, assim como do DAPI, foram feitas usando-se diferentes filtros de acordo com o espectro de emissão e cor da fluorescência, através do auxílio dos programas SmartCapture VP 4.15 (Alemanha) e BandView/FISHView (Brasil), que fazem a modulação do sistema de filtros (Tabela 6).

Tabela 6 – Propriedades dos filtros da firma Chroma Technology

NOME DO FILTRO	ESTIMULAÇÃO (nm)	COR (nm)	FILTRO DE EMISSÃO (nm)
FITC	450-490	510	515
TRITC/ Cy3	546	580	590
Cy5	640	680	690
DAPI	365	395	397

3.4.2. Captura de imagens e documentação

A documentação realizada na Alemanha foi através de uma câmera CCD acoplada ao microscópio (Photometrics C250/A, com um chip KAF 1400). As imagens foram processadas com ajuda do programa Smart Capture VP 4.15, e transferidas para um computador Macintosh, no qual os ajustes de contraste, observação das diferentes camadas e ajustes de cor foram efetuados com auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0. No Brasil, a documentação também foi realizada através de uma câmera VDS-CCD acoplada ao microscópio. As imagens foram processadas com ajuda do programa BandView/FISHView, e transferidas para um computador PC-WindowsXP, no qual os ajustes de contraste, observação das diferentes camadas e ajustes de cor foram efetuados com auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0 e 8.0.

4. RECONSTRUÇÃO DO CARIÓTIPO ANCESTRAL DOS ROEDORES

Para a construção de uma proposta do cariótipo ancestral dos roedores, partimos dos dados publicados por FROENICKE (2005). Estes dados deram origem a cariótipos ancestrais de dois grupos: um que o autor chamou de boreoeuteria, a partir da comparação de dados de pintura cromossômica em mais de 80 espécies de euteria e outro chamado de ancestral rodentia, onde foram utilizados dados do mapa genômico de esquilo, uma revisão sobre ZOO-FISH e o alinhamento das seqüências genômicas de rato, camundongo e homem.

Em posse da proposta do cariótipo do roedor ancestral, seguimos para a realização do processo de identificação das regiões de homeologia entre os cromossomos de MMU e de *Homo sapiens* (HSA), comparando-se as localizações de genes já descritos em ambas as espécies (Figura 2). Estes dados foram obtidos pela Internet no site <http://www.ensembl.org>. Depois, estas correspondências cromossômicas foram organizadas em um idiograma de MMU, que demonstra as homeologias dos cromossomos humanos (Figura 20, p.112 – Resultados).

Posteriormente, foram realizadas as comparações entre as associações sintênicas encontradas nos akodontinos sendo suas localizações projetadas nos respectivos cromossomos de MMU proporcionando a identificação das homeologias dos akodontinos com o genoma HSA (Figura 20).

5. ESTUDO CLADÍSTICO

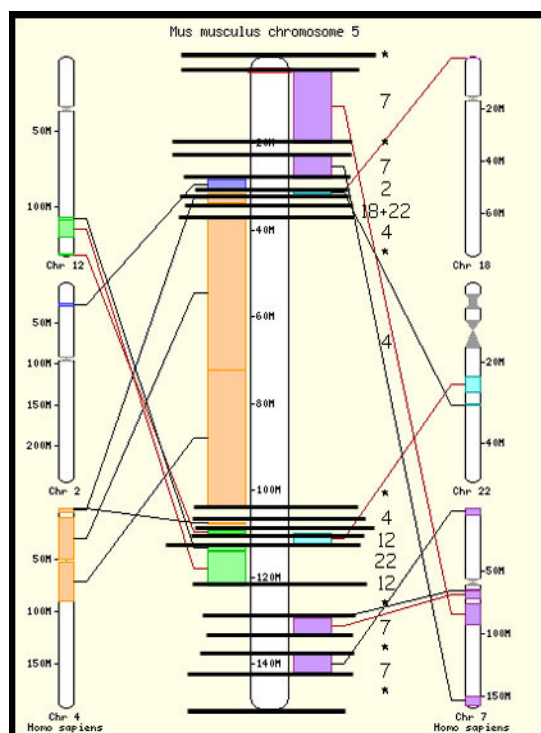
Para a análise dos caracteres e interpretação dos resultados foram utilizados os princípios conceituais e metodológicos da sistemática filogenética proposta por HENNIG (1965), explicitada de um modo geral por NAPP (1990), conforme OLIVEIRA et al. (2002). Esta metodologia foi adaptada aos dados citogenéticos.

5. 1. Métodos cladísticos numéricos

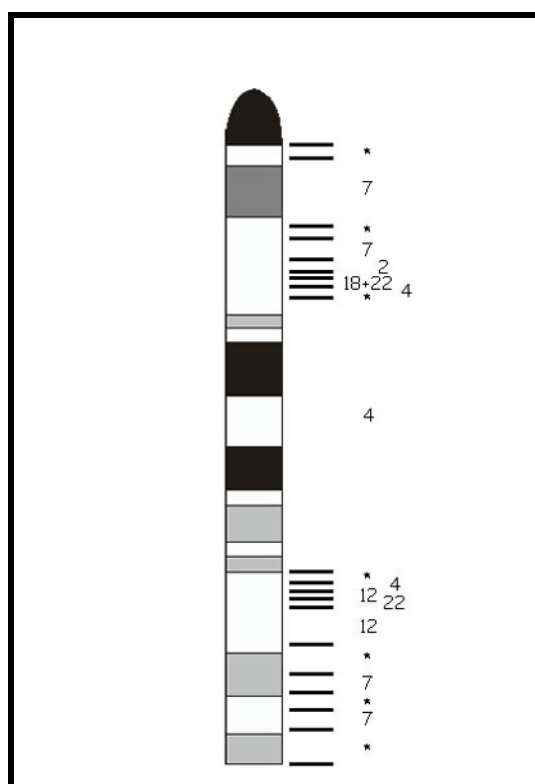
Para a realização das análises utilizamos métodos cladísticos numéricos baseados no critério de parcimônia. Esse método foi proposto por KLUGE e FARRIS (1969) baseado em WAGNER (1961, cf. NAPP, 1990). A técnica foi adaptada matematicamente por FARRIS (1970), e que se identifica como “árvore de Wagner”. Através deste método, entre todas as soluções possíveis, é indicada a mais curta e

Figura 2 – Modelo de comparação cariotípica entre MMU e HSA: a) cromossomo extraído de bancos de dados; b) ideograma do cromossomo de MMU com os respectivos segmentos cromossômicos de HSA assinalados no lado direito

a)



b)



parcimoniosa, portanto não existem restrições em relação às mudanças que os caracteres e os estados de caracteres possam sofrer. Assim sendo, um mesmo carácter pode ocorrer mais de uma vez, independentemente ou reverter para um estado mais primitivo. Por isso, a solução mais curta estará levando em conta o número de passos extras - homoplasias e reversões (SWOFFORD, 1985).

A partir da aplicação da análise pelo método de parcimônia, no estudo cladístico, procurou-se inferir as relações de parentesco entre as diferentes espécies da TRIBO AKODONTINI, ocorrentes na Região Sul do Brasil, fundamentadas nos estudos cromossômicos. Para tanto, foi utilizado o programa PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*), que lança mão da utilização do método algorítmico para maximizar o critério de otimização da árvore resultante. No ponto inicial da árvore, encontra-se o ancestral - que pode ser hipotético ou não -, seguido pelas taxa de menores distâncias (maiores similaridades), que vão sendo agrupadas sucessivamente, até a inclusão de todos os taxa.

O cladograma resultante, dentre as várias possibilidades e alternativas contidas no programa PAUP, corresponde àquela mais parcimoniosa e de melhor estimativa da filogenia (CAMIN e SOKAL, 1965). Para sua obtenção, foram programadas as seguintes opções: **swap=global** (analisa todas as possibilidades de árvores); **root=ancestor** (utiliza o táxon considerado ancestral para enraizar a árvore resultante); **option=farris ou acctran** (acelera a transformação do caráter, favorecendo as homoplasias); **change list** (fornece a lista de modificações sofridas por cada caráter); **apomorphic list** (fornece o estado apomórfico dos caracteres) e **treeout** (para obter ramos de mesmo comprimento).

5. 2. Polarização

A sistemática filogenética objetiva-se no reconhecimento de grupos monofiléticos e na interpretação dos seus padrões de parentesco. Sendo assim, é de fundamental importância o reconhecimento das sinapomorfias (compartilhamento de caracteres ou estados de caracteres derivados) na metodologia cladística, considerando que estas são as evidências válidas para justificar a existências de grupos monofiléticos. A comparação com o grupo externo (WATHROUS; WHEELER, 1981), auxilia no reconhecimento das homeologias, e é um dos critérios

mais utilizados e justificados baseado na metodologia da parcimônia (NELSON; PLATNICK, 1981; MADDISON, 1984).

Esta metodologia foi adaptada aos achados citogenéticos – padrões de bandas G e FISH, usados como caracteres para serem transformados em dados na formulação de uma hipótese filogenética para a Tribo AKODONTINI. Como grupo externo utilizaram-se os cariótipos e dados de hibridação de *Mus musculus* e *Cricetulus griseus*, espécie representante dos Cricetidae europeus, que já foi hibridada com sondas cromossomo-específicas de MMU (YANG; O'BREIN; FERGUSON-SMITH, 2000).

5. 3. Análise das hibridações

As comparações foram feitas utilizando-se como caracteres os braços dos cromossomos, diferenciados pela banda G (em Actinomicina D/DAPI) e FISH. Cada sinal fluorescente obtido pela hibridação com as sondas cromossomo-específicas de MMU, foram consideradas como caráter, bem como o número de sinais que cada sonda produziu em cada uma das espécies estudadas. Alguns destes sinais representam sintenias, ou seja, presença de apenas um sinal produzido por uma sonda qualquer de MMU que hibridou em apenas um cromossomo ou segmento cromossômico nas espécies de akodontinos. Quando presentes dois ou mais sinais no mesmo cromossomo ou braço cromossômico denomina-se associação ou associação sintênica. As sintenias e as associações também foram consideradas caracteres, e utilizadas na matriz de dados para a análise filogenética através do programa PAUP.

Para se definir os segmentos cromossômicos, compartilhados ou não entre os diferentes taxa, foram comparados os cariótipos bandeados de todos os taxa e organizados em uma tabela de presença ou ausência do caracter, que deu origem a matriz geral de dados (Anexo 2).

Após estas comparações e construção da tabela, foram atribuídos os seguintes valores: 0 ao estado primitivo dos caracteres primitivos; 1 ao estado derivado e 9 ao estado não comparável originando a matriz geral de dados (Anexo 3) que foi utilizada para a análise com o programa PAUP.

Foram feitas quatro análises distintas, divididas em dois grupos:

1. Relações Filogenéticas entre os Akodontinos, onde foram feitas duas análises levando-se em consideração *Cricetulus griceus* (CGR) ou *Mus musculus* (MMU) como grupo externo;
2. Relações Filogenéticas entre os Akodontinos acrescidos dos dados da Literatura, onde em cada uma das duas análises realizadas, foi utilizada uma espécie como grupo externo: *Cricetulus griceus* (CGR) ou *Mus musculus* (MMU).

A utilização de dois diferentes grupos externos deve-se ao fato que MMU ser pertencente ao grupo Muridae, enquanto que CGR pertence aos Cricetidae europeus, proporcionando assim, a possibilidade de panoramas diferentes nas análises, na tentativa de melhor agrupar os nossos dados e os da literatura.

O índice de consistência refere-se às presenças de homoplasias observadas (retenção de semelhança entre os indivíduos = sinapomorfias), e quanto maior o número destas o índice se aproxima de 0. O índice de retenção refere-se as autapomorfias (estado derivado de um caráter restrito), este se aproxima de 0 quanto maior for o número de autapomorfias (AMORIM, 1997).

Utilizou-se Bootstrap (FELSESTEIN, 1985) como teste de confiabilidade das árvores genéticas obtidas. Consideramos como Bootstrap significativo valores acima de 95%, moderados de 70-94% e fracos de 51-69% conforme LI (1997) e HILLIS; BULL (1993).

III. RESULTADOS

1. Cariótipos em Banda G

Foram utilizados cariótipos em bandeamento G para a preparação dos mapas cromossômicos de cada uma das espécies estudadas. Porém por motivos técnicos, tivemos que descartar a utilização do bandeamento G (com tripsina) e o bandeamento G por Wright, aqui testados, pois as hibridações subseqüentes não apresentaram resultados satisfatórios.

Assim, posteriormente às hibridações, cada lâmina foi submetida a um tratamento com Actinomicina D/DAPI que proporciona uma marcação cromossômica similar à banda G, possibilitando, desta forma, a determinação ou identificação correta dos cromossomos marcados por sinais de ZOO-FISH de MMU nas espécies aqui estudadas.

Para mantermos o padrão dos nossos dados com àqueles preconizados para publicações, utilizamos metáfases e cariótipos montados em bandeamento GTG de cada uma das espécies aqui estudadas, sendo estas preparações cromossômicas gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Ives José Sbalqueiro.

2. Obtenção de sondas espécie-específicas

Foram preparadas sondas espécie-específicas, GISH, de pelo menos dois exemplares de cada uma das espécies de akodontinos, de preferência indivíduos de ambos os sexos. Os exemplares com os respectivos iniciadores estão relacionados na Tabela 7. Neste processo foram utilizados dois iniciadores diferentes, as primeiras hibridações com sondas cromossomo-específicas foram realizadas com o iniciador 6MW. No decorrer do trabalho tivemos a necessidade de utilizar o iniciador F/S, tendo sido realizadas também preparações de sondas espécie-específicas com este iniciador, para verificar a viabilidade da mesma e agilizar a preparação das misturas de reação para proceder com as DOP-PCR.

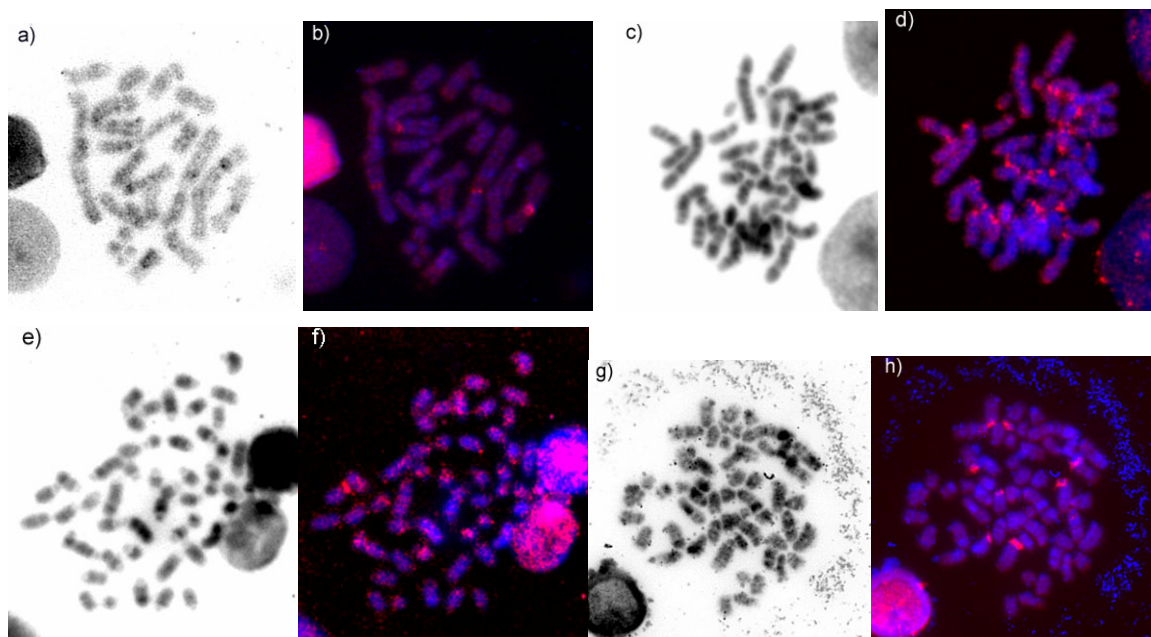
Estas sondas espécie-específicas, feitas a partir de DNA genômico de cada espécie de akodontino, apresentaram bons resultados e indicaram os exemplares que melhor serviram para as etapas seguintes de hibridação com sondas cromossomo-específicas de MMU (Figura 3). Observou-se que as regiões

centroméricas dos cromossomos, e não centroméricas em alguns casos como em *A. montensis*, apresentaram marcações intensas indicando a localização de regiões heterocromáticas que são normalmente evidenciadas em banda C.

Tabela 7 – Protocolo das espécies em que foram preparadas sondas espécie-específicas, mostrando o iniciador utilizado

PROT	TAXA	INICIADOR
P702	<i>Akodon cursor</i>	6MW
P722		F/S
P732		6MW
P733		F/S
P738		F/S
P765		F/S
P827	<i>Akodon montensis</i>	6MW
P871		F/S
F725		F/S
P875	<i>Akodon paranaensis</i>	F/S
P890		6MW
P851	<i>Akodon serrensis</i>	6MW
P854		F/S
P856		6MW
F6559	<i>Thaptomys nigrita</i>	6MW
P889		6MW
P524	<i>Necromys lasiurus</i>	6MW
F6749		F/S
F6750		6MW
F6803	<i>Oxymycterus sp</i>	F/S
F6851		6MW
F5089	<i>Brucepattersonius griserufescens</i>	6MW
F6872		F/S

Figura 3 - Foto das metáfases com hibridação espécie-específica: a) e b) AMO; c) e d) APA; e) e f) BRU; g) e h) TNI. As fotos: a), c), e) e g) são as metáfases com contra coloração de Actinomicina D/DAPI. As fotos: b), d), f) e h) são as respectivas metáfases com sondas em coloração vermelha (biotina-Cy5) e em azul DAPI, mostrando forte marcação em vermelho das regiões heterocromáticas



3. Hibridações com sondas cromossomo-específicas de *Mus musculus*

Durante a realização das hibridações com as sondas cromossomo-específicas de MMU notou-se que algumas das sondas não apresentaram hibridação satisfatória, como foi o caso das sondas dos cromossomos 10 e 18 que podem estar envolvidas em inúmeros rearranjos cromossômicos nas espécies de akodontinos, sendo assim não detectável a sua localização cromossômica.

Verificamos também, que de um modo geral, as hibridações neste trabalho apresentaram um número menor de homeologias do que aquelas descritas na literatura. Desta forma, identificamos através da hibridação de 20 sondas de MMU (19 autossômicas, mais a sonda do cromossomo X), 32 homeologias em ACU, OSP e TNI, 29 em APA e NLA, 27 em AMO e BGR e 25 em ASE.

3. 1. Hibridação entre *Mus musculus*, $2n = 40$, e *A. cursor*, $2n = 14, 15$ e 16

As hibridações entre as sondas de rato de laboratório MMU, em metáfases de *A. cursor* (ACU) mostraram-se satisfatórias. Foram utilizadas sondas cromossomo-específicas 1 a 19 autossômicas mais as dos sexuais X e Y para delimitar os segmentos homeólogos em *A. cursor*. O cromossomo X hibridizou inteiramente no

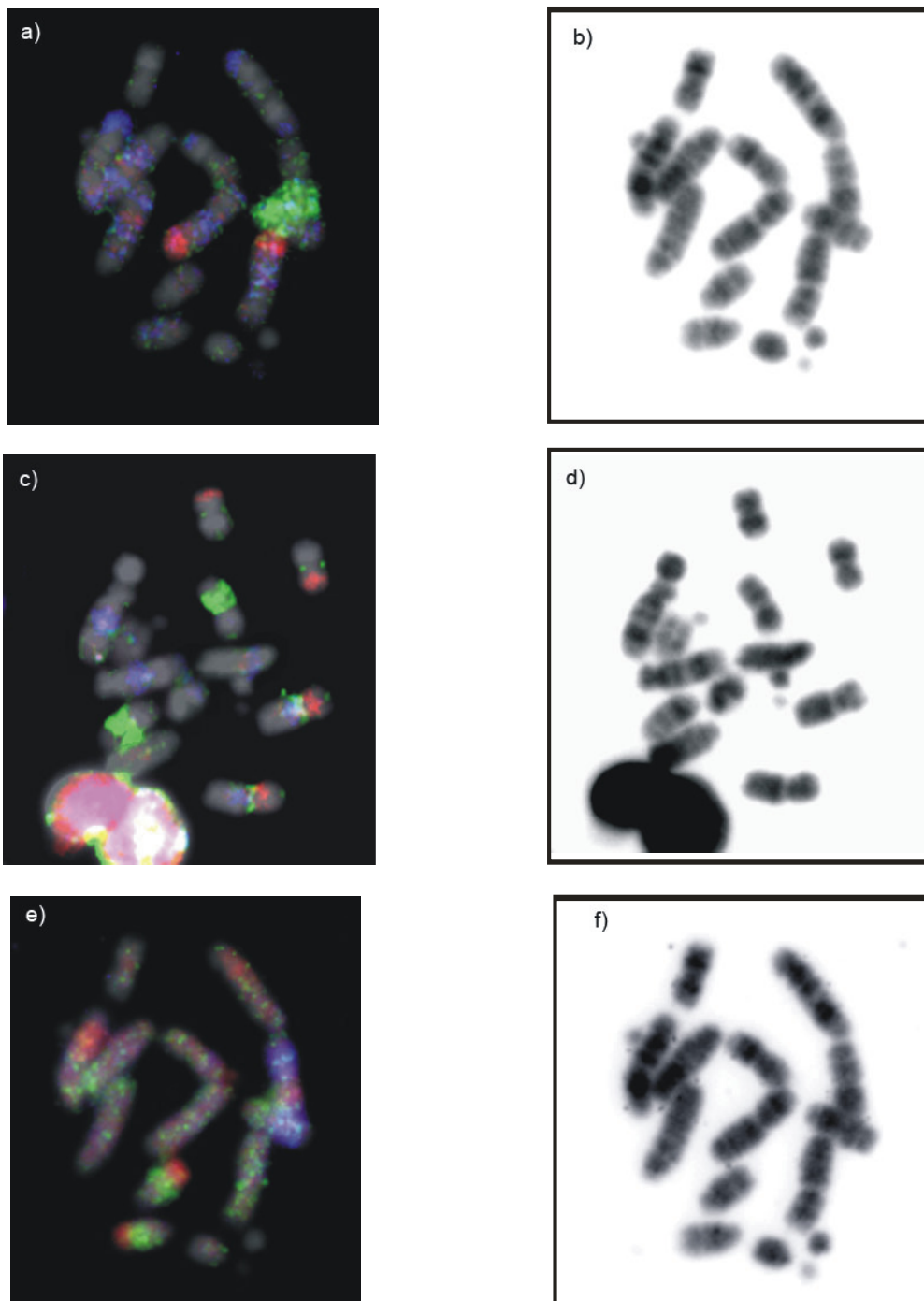
cromossomo X de *A. cursor*. As 20 sondas de MMU (19 autossômicas mais a sonda do X), revelaram 32 regiões de homeologias no genoma de *A. cursor* (Figura 4 – a) a r)). O par cromossômico 6 de ACU não apresentou homeologia com nenhuma sonda cromossômica de MMU.

As associações cromossômicas (um cromossomos de ACU que apresenta sinais de diferentes sondas de MMU, por exemplo, a associação 8/13, onde se verifica a hibridação do cromossomo 5 de ACU com as sondas MMU-8 e -13), observadas nessa espécie foram em número de 29: 1/3, 1/6, 1/9, 1/10, 1/11, 1/15, 1/16, 1/17, 2/5, 3/18, 4/5, 4/17, 4/18, 5/7, 5/12, 6/10, 6/12, 6/14, 7/19, 8/13, 9/10, 10/17, 12/17, 14/17, 15/16, 2/5/7/19, 6/10/14/17, 12/17/10/9/1/3/1/10 e 3/18/4/5/12/6/1/17/4/15/16/1/11. Estas representam os segmentos produzidos pelas sondas de MMU no genoma de ACU (Figura 5). Cada associação foi descrita conforme a ordem de localização em ACU, as associações complexas foram consideradas em conjunto (um caracter) e também desmembradas par a par, resultando em outros caracteres: por exemplo, a associação 2/5/7/19, resultou em três outros caracteres: 2/5, 5/7 e 7/19.

O mapeamento das homeologias cromossômicas entre *Mus musculus* e *A. cursor* são mostrados na Figura 5. Este mapa cromossômico apresenta o cariótipo de *A. cursor* com a numeração segundo SBALQUEIRO; NASCIMENTO (1996). Ao lado de cada cromossomo estão delimitadas as regiões e/ou cromossomos hibridados pelas sondas de MMU, as regiões onde não foram evidenciados sinais de hibridação estão representadas por asterisco. A sua elaboração ocorreu após a finalização dos experimentos de hibridação em ACU e é resultante da compilação de três exemplares, cada um com número diplóide diferente (14, 15 e 16 cromossomos). Estas foram realizadas para a verificação da repetibilidade dos experimentos bem como para a melhor visualização das hibridações nos cromossomos que envolvem o rearranjo complexo do par 1 de ACU.

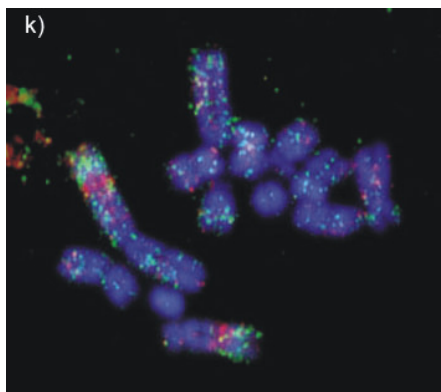
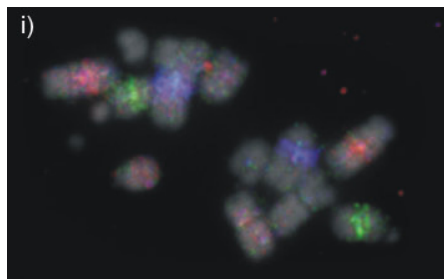
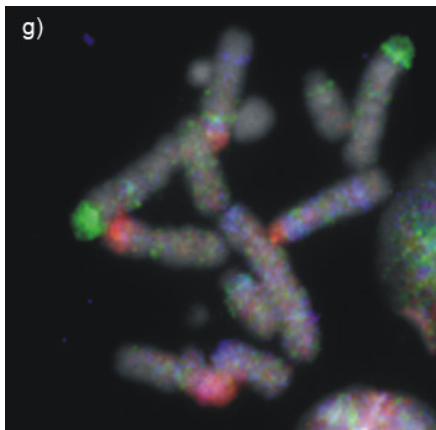
Figura 4 – a) a r): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo-específicas de MMU em metáfases de *Akodon cursor*, $2n = 14, 15$ e 16 . a) marcações em azul do cromossomo 1, em verde do cromossomo 2 e em vermelho do cromossomo 3; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em azul do cromossomo 4, em verde do cromossomo 5 e em vermelho do cromossomo 6; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em azul do cromossomo 7, em verde do cromossomo 8 e em vermelho do cromossomo 9; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



g) marcações em azul do cromossomo 10, em verde do cromossomo 11 e em vermelho do cromossomo 12; h) metáfase (g) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; i) marcações em azul do cromossomo 13, em verde do cromossomo 14 e em vermelho do cromossomo 15; j) metáfase (i) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; k) marcações em vermelho do cromossomo 15 e em verde do cromossomo 16; l) metáfase (k) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



m) marcações em vermelho do cromossomo 17; n) metáfase (m) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; o) marcações em verde do cromossomo 18; p) metáfase (o) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; q) marcações em azul do cromossomo 19 e em verde do cromossomo X; r) metáfase (q) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI

conclusão

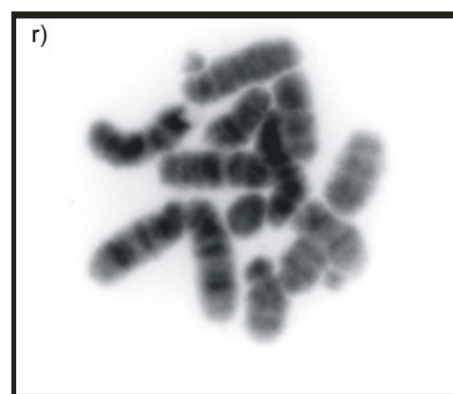
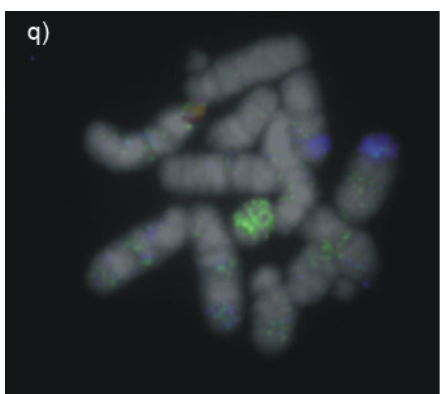
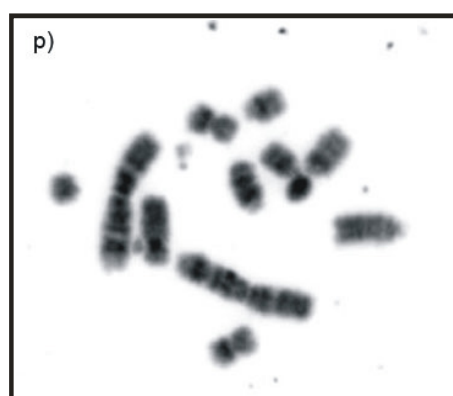
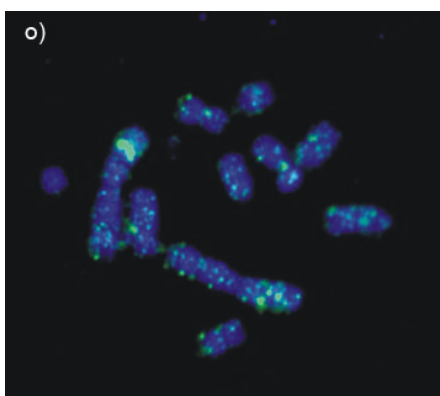
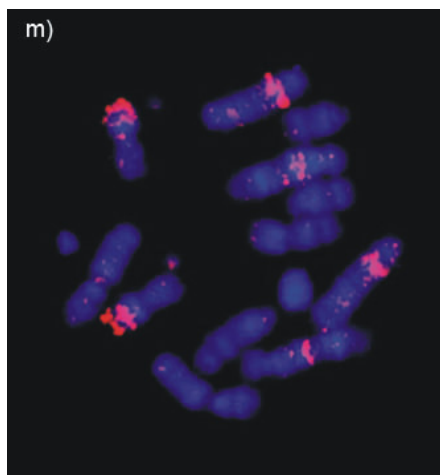
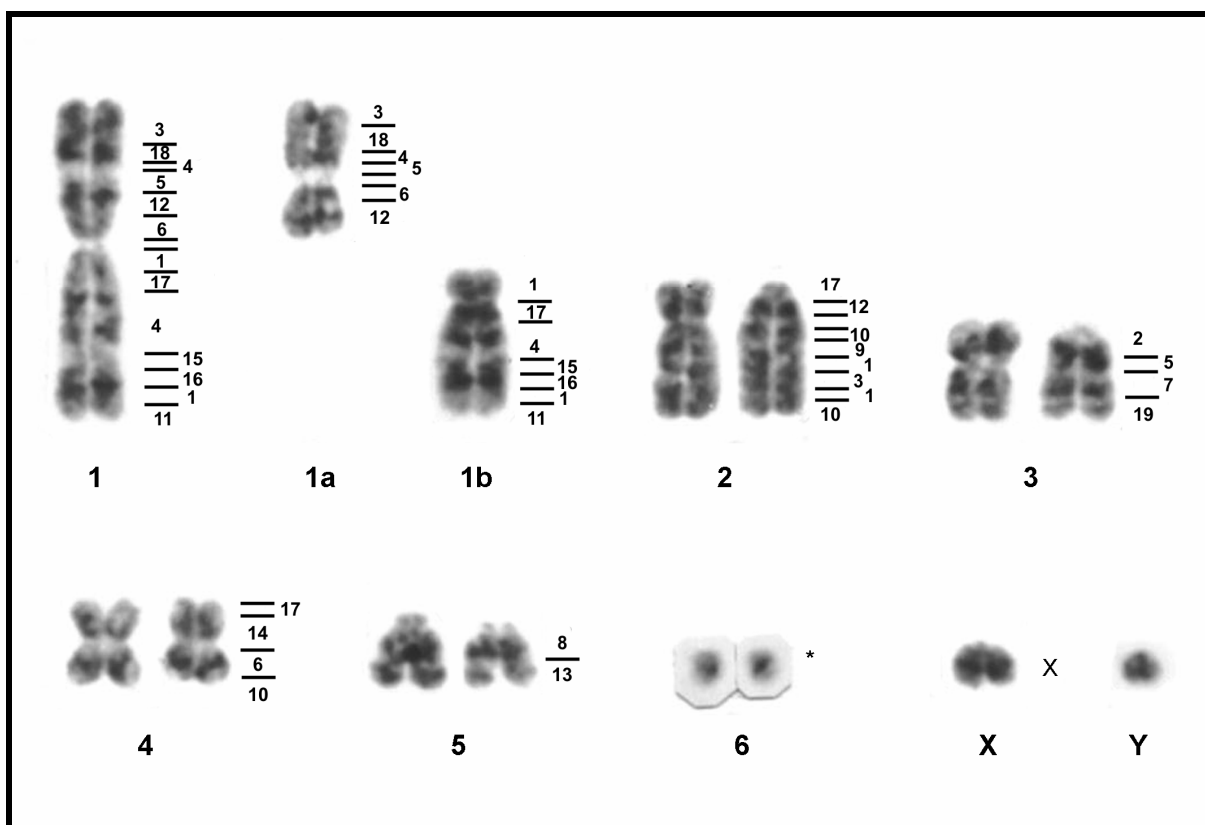


Figura 5 – Cariótipo em banda G (conforme SBALQUEIRO; NASCIMENTO, 1996) de *Akodon cursor*, $2n = 15$, onde os cromossomos estão numerados abaixo. A hibridação com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita. O asterisco denota regiões não hibridadas



3. 2. Hibridação entre *Mus musculus*, $2n = 40$ e *A. montensis*, $2n = 24$

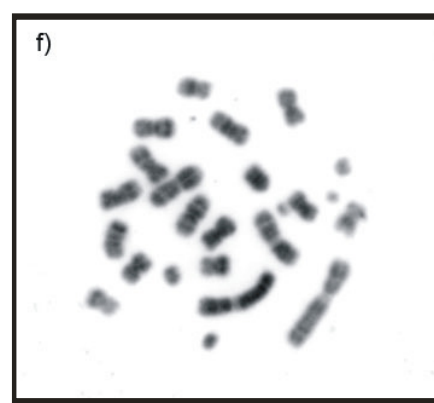
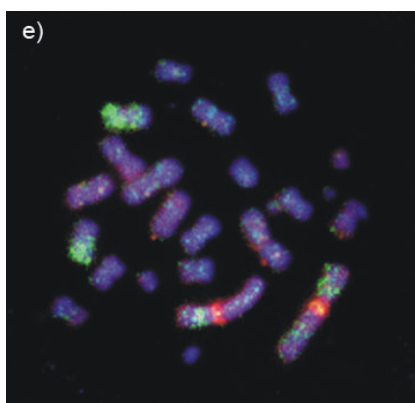
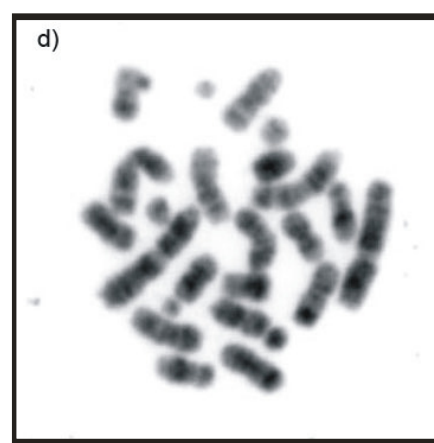
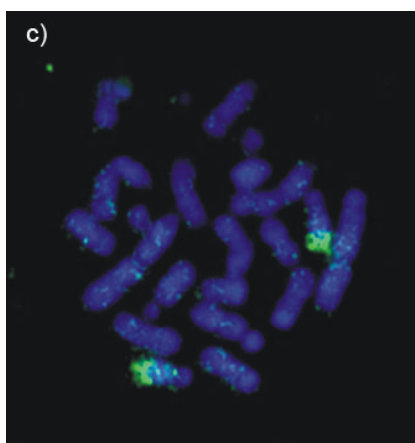
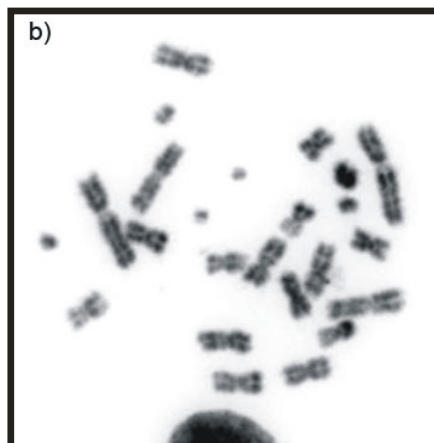
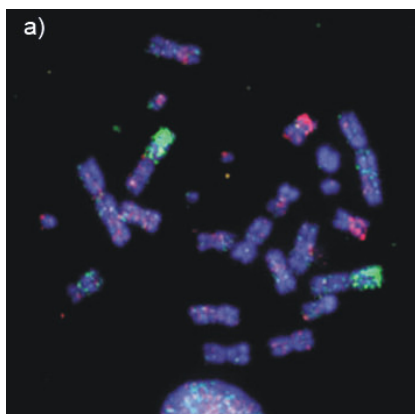
As hibridações das sondas de *Mus musculus* em metáfases de *A. montensis* (AMO) mostraram-se satisfatórias. Foram utilizadas as sondas cromossomo-específicas 1 a 19 mais as dos cromossomos sexuais X e Y, para delimitar os segmentos homeólogos em AMO. A sonda do cromossomo X de MMU hibridizou inteiramente no X de AMO, e o cromossomo Y não apresentou marcação específica. As 20 sondas de MMU revelaram 27 regiões de homeologias no genoma de AMO (Figura 6 – a) a w)). Também em AMO o par cromossômico 11 não apresentou homeologia com nenhuma sonda de MMU.

Nesta espécie foram verificadas 20 associações: 1/11, 2/7, 3/12, 3/16, 3/18, 4/15, 5/17, 5/18, 6/12, 6/14, 6/17, 7/19, 8/13, 8/17, 9/10, 13/16, 2/7/19, 12/3/16, 13/8/17, 12/6/17/5/18/3. Estas associações estão mostradas na Figura 7, e seguiram o mesmo padrão de descrição relatado em ACU, item 3.1.

O mapa das homeologias cromossômicas entre *Mus musculus* e *A. montensis* são mostrados na Figura 7. Este apresenta o cariótipo de AMO com a numeração segundo SBALQUEIRO (1989), sendo que ao lado de cada cromossomo estão delimitadas as regiões e/ou cromossomos hibridados pelas sondas de MMU, e as regiões onde não foram evidenciados sinais de hibridação estão representadas por asterisco.

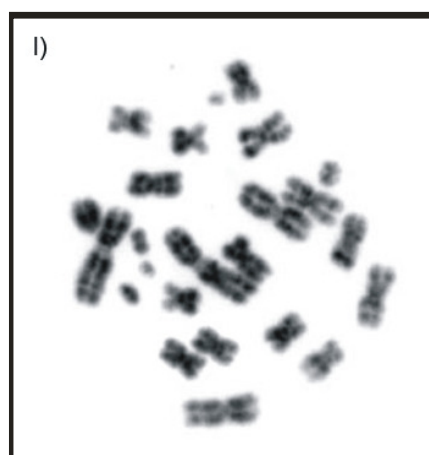
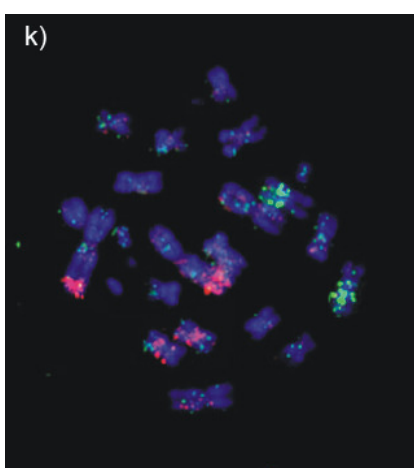
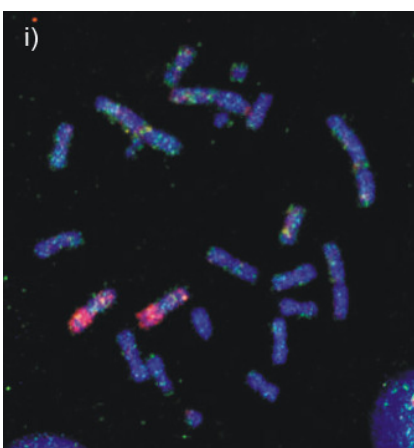
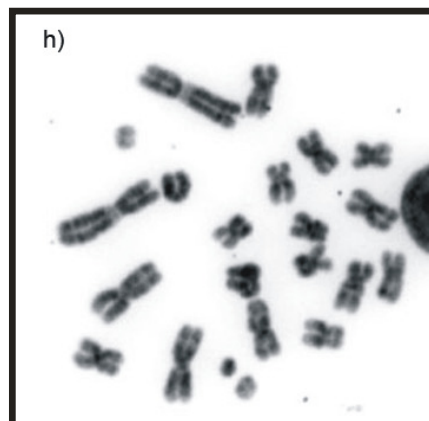
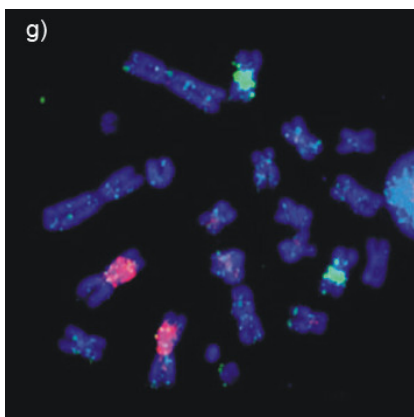
Figura 6 – a) a w): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Akodon montensis*, $2n = 24$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 5 e em verde do cromossomo 6; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



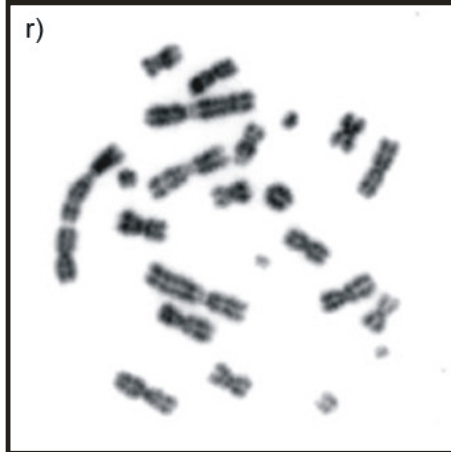
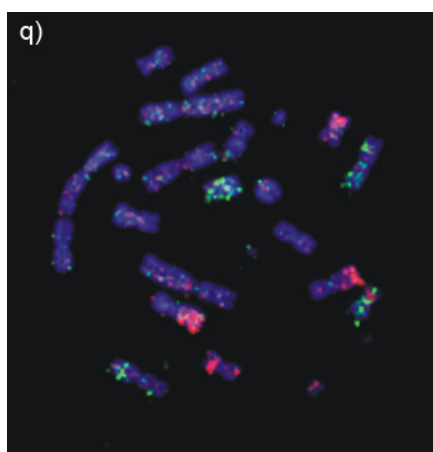
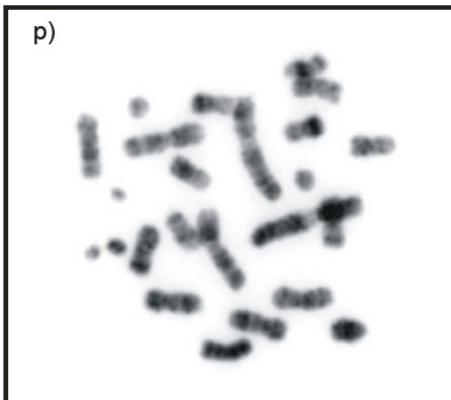
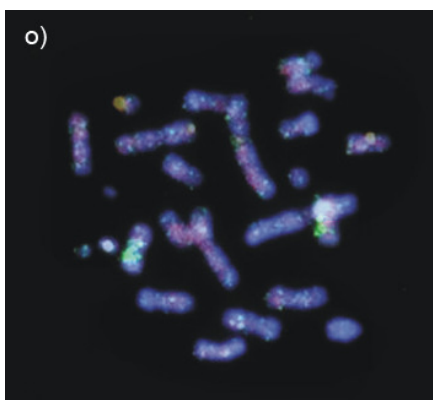
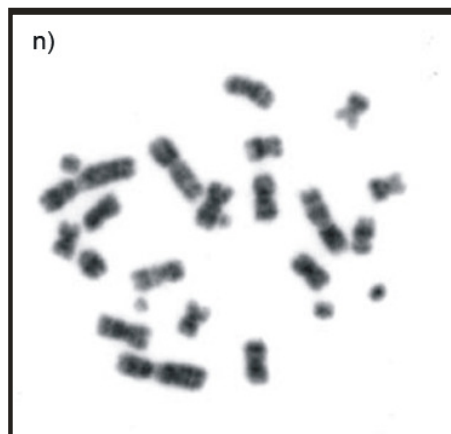
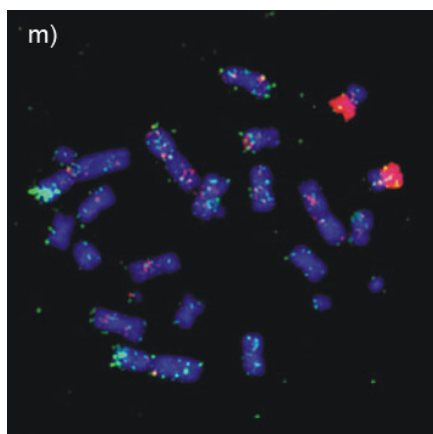
g) marcações em vermelho do cromossomo 7 e em verde do cromossomo 8; h) metáfase (g) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; i) marcações em vermelho do cromossomo 9; j) metáfase (i) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; k) marcações em vermelho do cromossomo 3 e em verde do cromossomo 10; l) metáfase (k) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



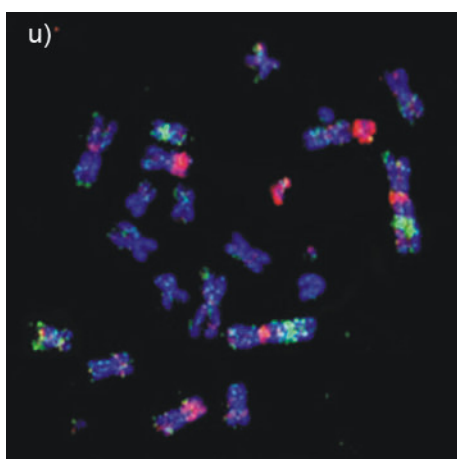
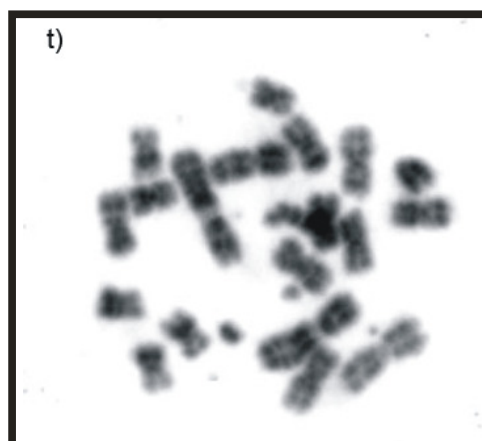
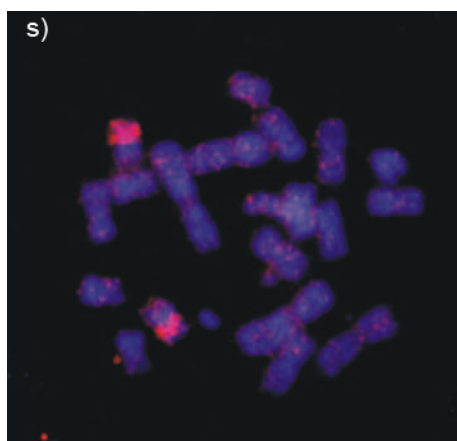
m) marcações em vermelho do cromossomo 11 e em verde do cromossomo 12; n) metáfase (m) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; o) marcações em verde do cromossomo 14; p) metáfase (o) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; q) marcações em vermelho do cromossomo 13 e em verde do cromossomo 16; r) metáfase (q) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



s) marcações em vermelho do cromossomo 15; t) metáfase (s) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; u) marcações em vermelho do cromossomo 17 e em verde do cromossomo 18; v) metáfase (u) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



x) marcações em verde do cromossomo X; z) metáfase (x) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; w) marcações em vermelho do cromossomo 19; y) metáfase (w) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

conclusão

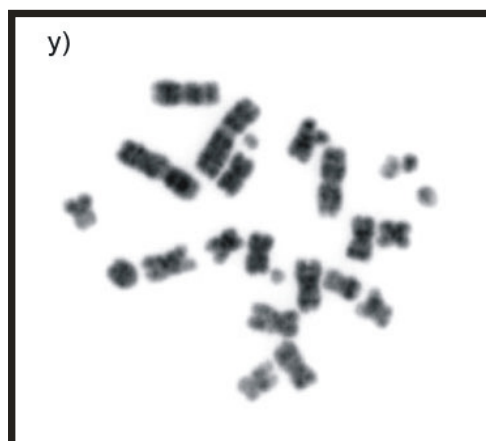
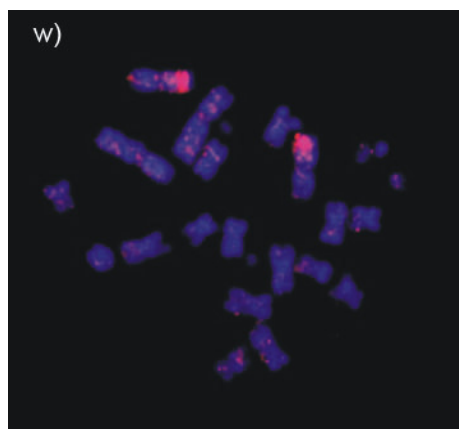
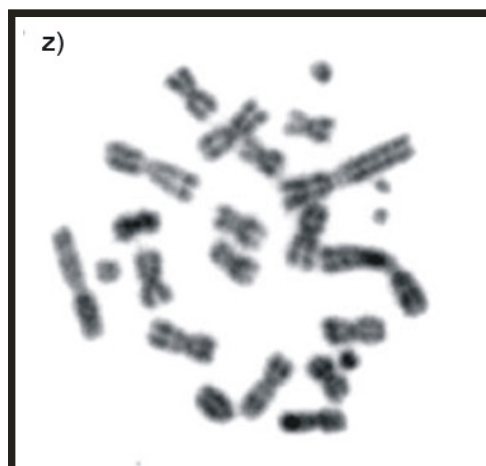
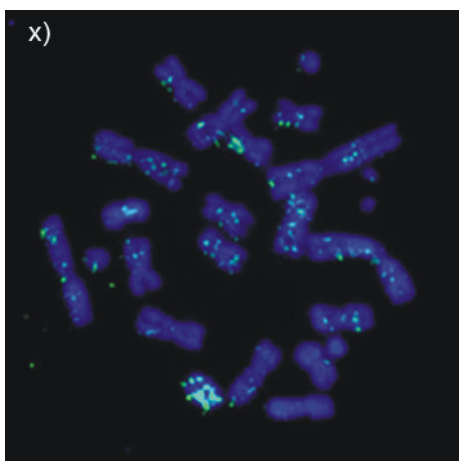
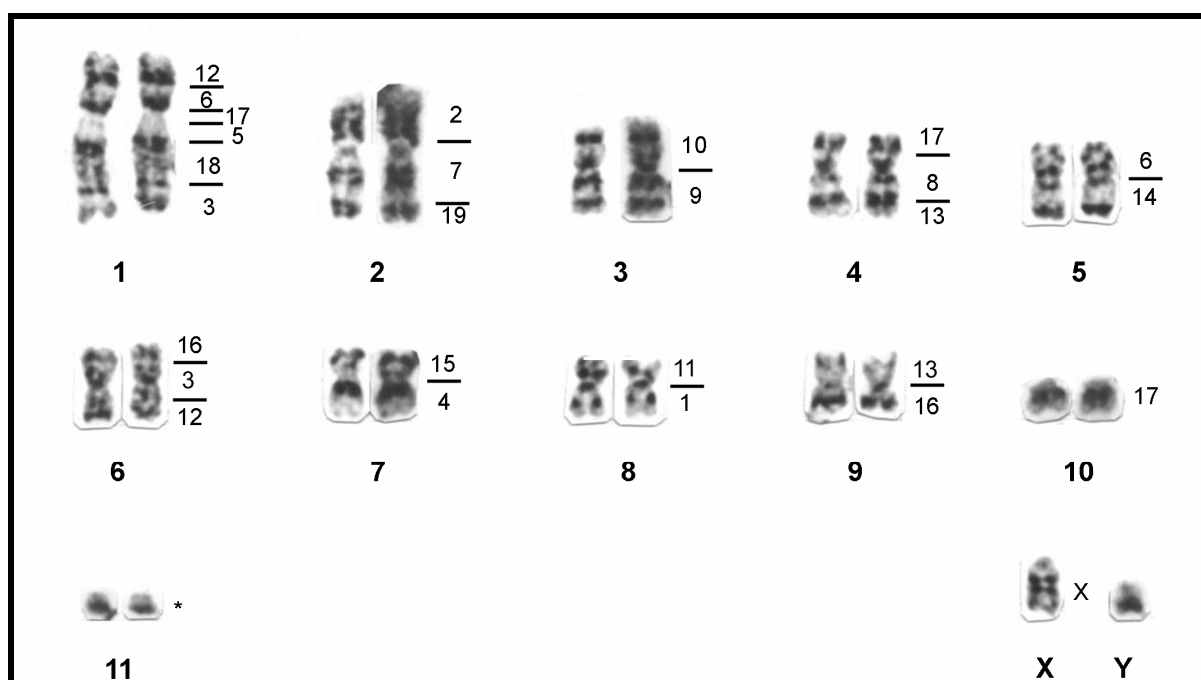


Figura 7 – Cariótipo em banda G de *Akodon montensis*, $2n = 24$, onde o número de cada cromossomo está colocado abaixo do mesmo, conforme SBALQUEIRO (1989). A hibridação com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão indicadas à direita. O asterisco denota regiões não hibridadas



3. 3. Hibridação entre *Mus musculus*, $2n = 40$, e *A. paranaensis*, $2n = 44$

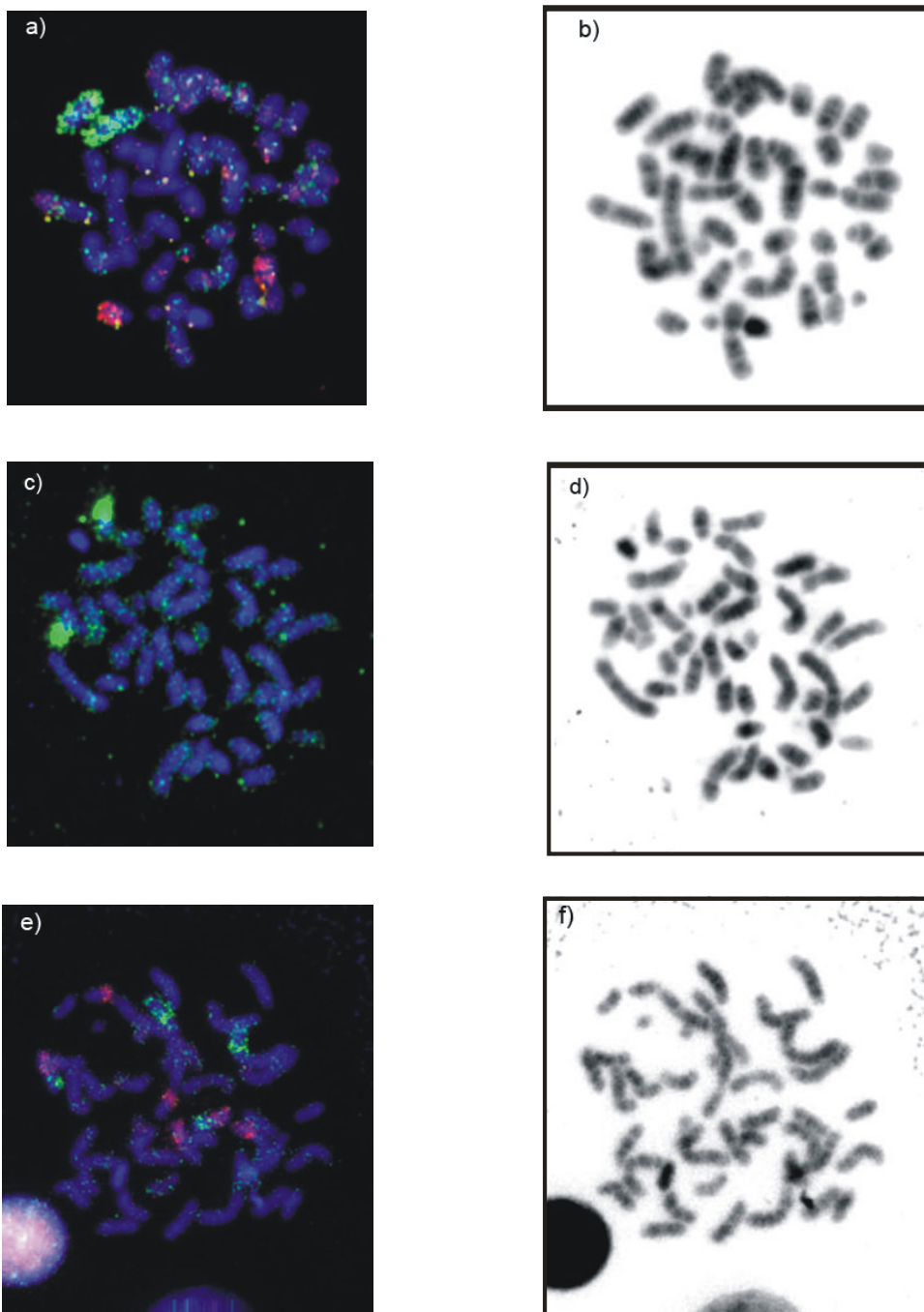
As hibridações entre *Mus musculus* (rato de laboratório) e *A. paranaensis* (APA) mostraram-se satisfatórias. Foram utilizadas sondas cromossomo-específicas dos cromossomos 1 a 19 mais as dos sexuais X e Y de rato de MMU para delimitar os segmentos homeólogos em APA. A sonda X hibridizou inteiramente o cromossomo X de APA e o Y permaneceu sem marcação. As sondas autossômicas revelaram 29 regiões de homeologia no genoma de APA (Figura 8 – a) a z)). O par cromossômico 21 não foi hibridado por nenhuma sonda cromossômica de MMU.

Foram verificadas nove associações sendo: 3/10, 3/18, 6/12, 7/19, 8/13, 10/11, 11/12 e 10/11/12. A associação 10/11 foi observada duas vezes em cromossomos diferentes de APA. As associações estão indicadas na Figura 9, e seguiram o mesmo padrão de descrição relatado em ACU, item 3.1.

O mapa das homeologias cromossômicas entre *Mus musculus* e *A. paranaensis* são mostrados na Figura 9. Este apresenta o cariótipo de APA com a numeração conforme SBALQUEIRO (1989), sendo que ao lado de cada cromossomo estão delimitadas as regiões e/ou cromossomos hibridados pelas sondas de MMU. As regiões onde não foram evidenciados sinais de hibridação estão representadas por asterisco.

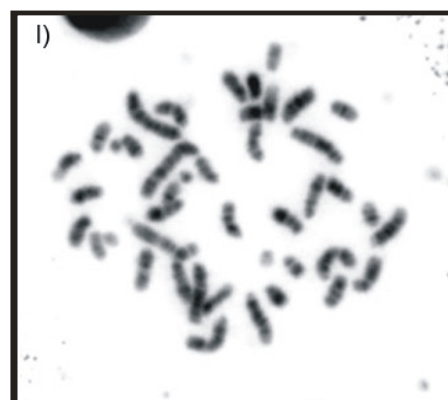
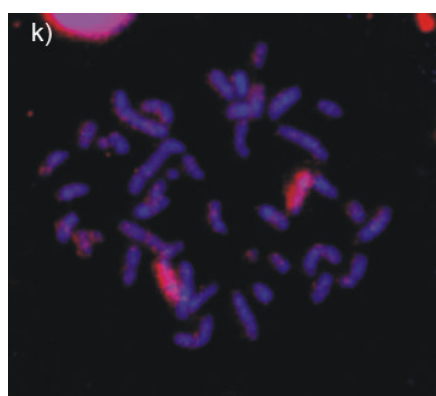
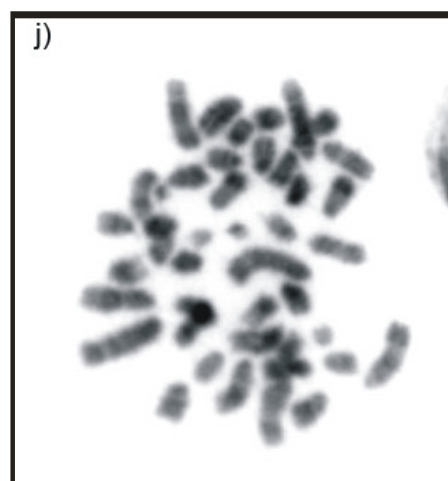
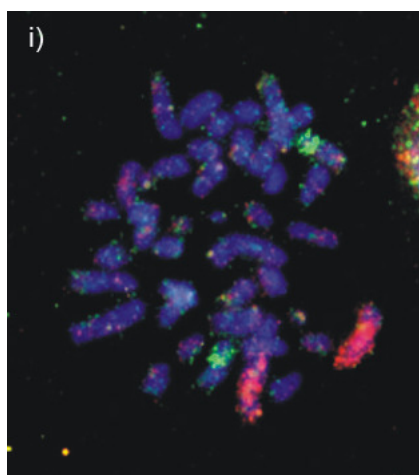
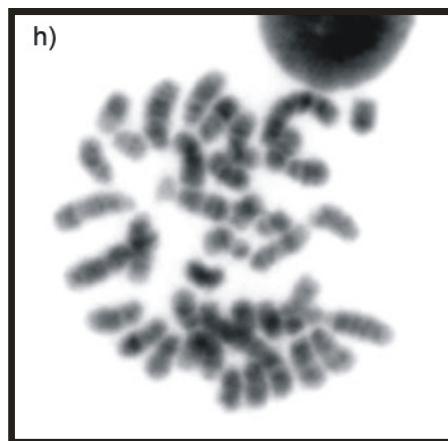
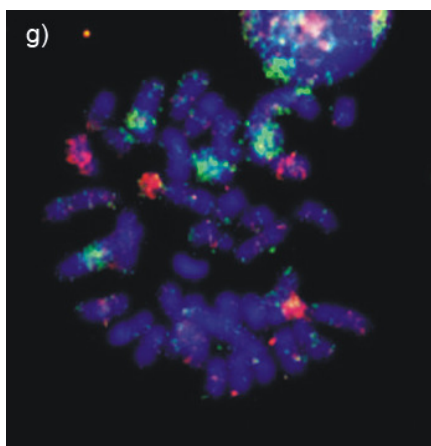
Figura 8 – a) a z): Híbridões *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Akodon paranaensis*, $2n = 44$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 10 e em verde do cromossomo 3; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



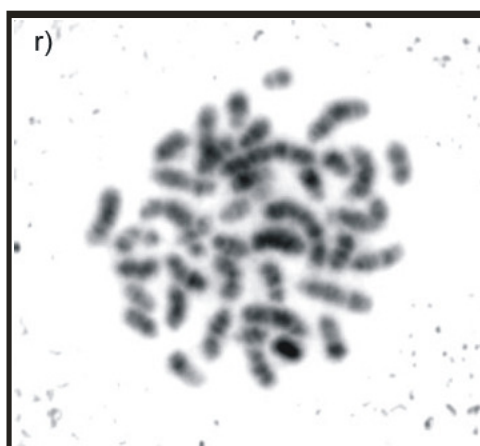
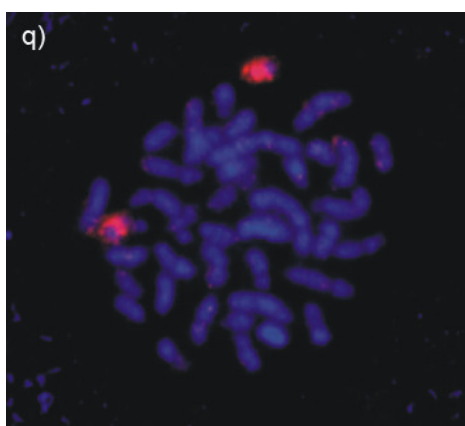
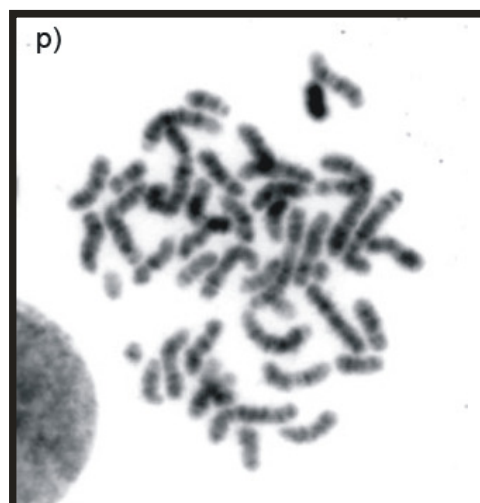
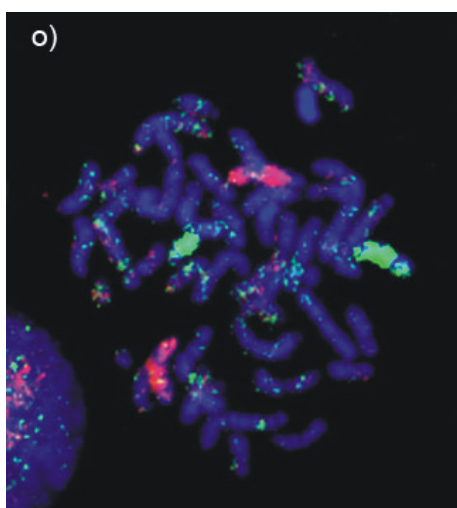
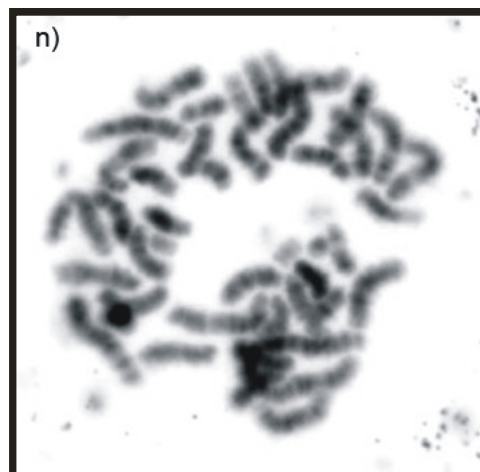
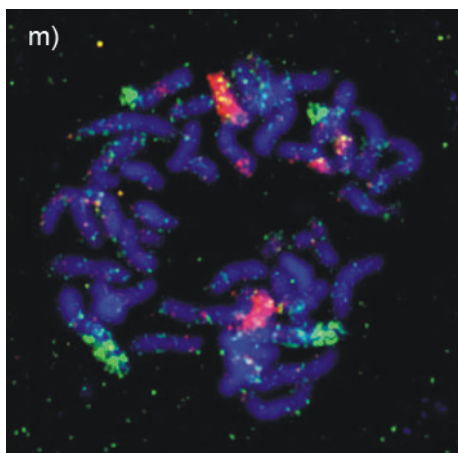
g) marcações em vermelho do cromossomo 5 e em verde do cromossomo 6; h) metáfase (g) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; i) marcações em vermelho do cromossomo 7 em verde do cromossomo 8; j) metáfase (i) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; k) marcações em vermelho do cromossomo 9; l) metáfase (k) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



m) marcações em vermelho do cromossomo 11 e em verde do cromossomo 12; n) metáfase (m) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; o) marcações em vermelho do cromossomo 13 e em verde do cromossomo 14; p) metáfase (o) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; q) marcações em vermelho do cromossomo 15; r) metáfase (q) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



s) marcações em verde do cromossomo 16; t) metáfase (s) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; u) marcações em vermelho do cromossomo 17 e em verde do cromossomo 18; v) metáfase (u) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; x) marcações em vermelho do cromossomo 19 e verde do cromossomo X; z) metáfase (x) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI

conclusão

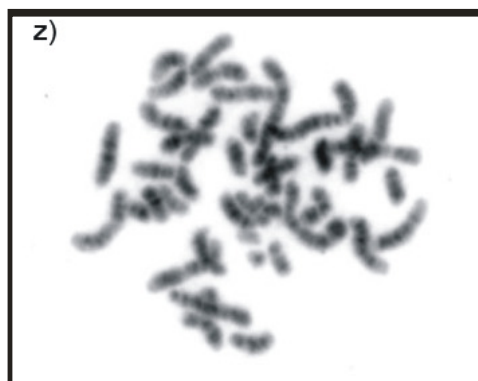
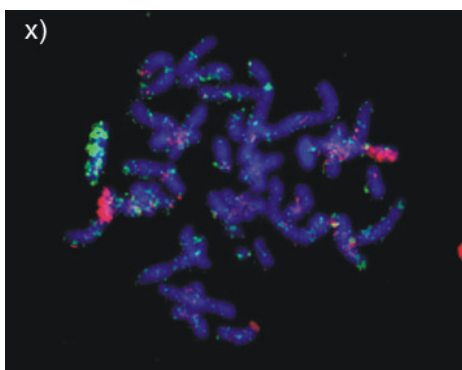
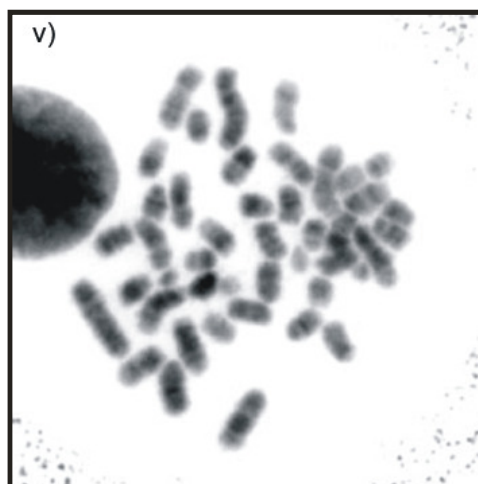
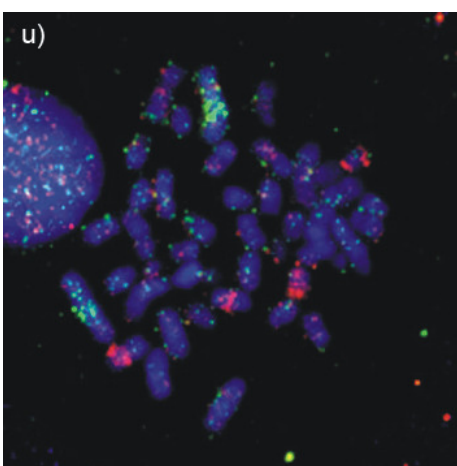
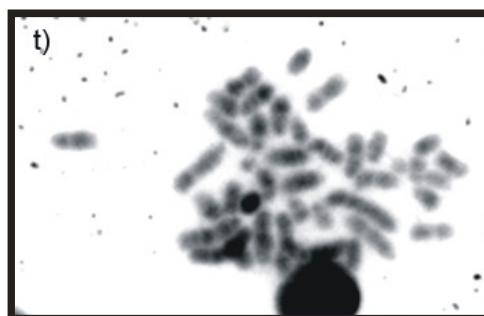
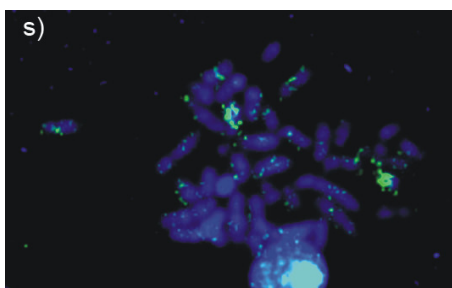
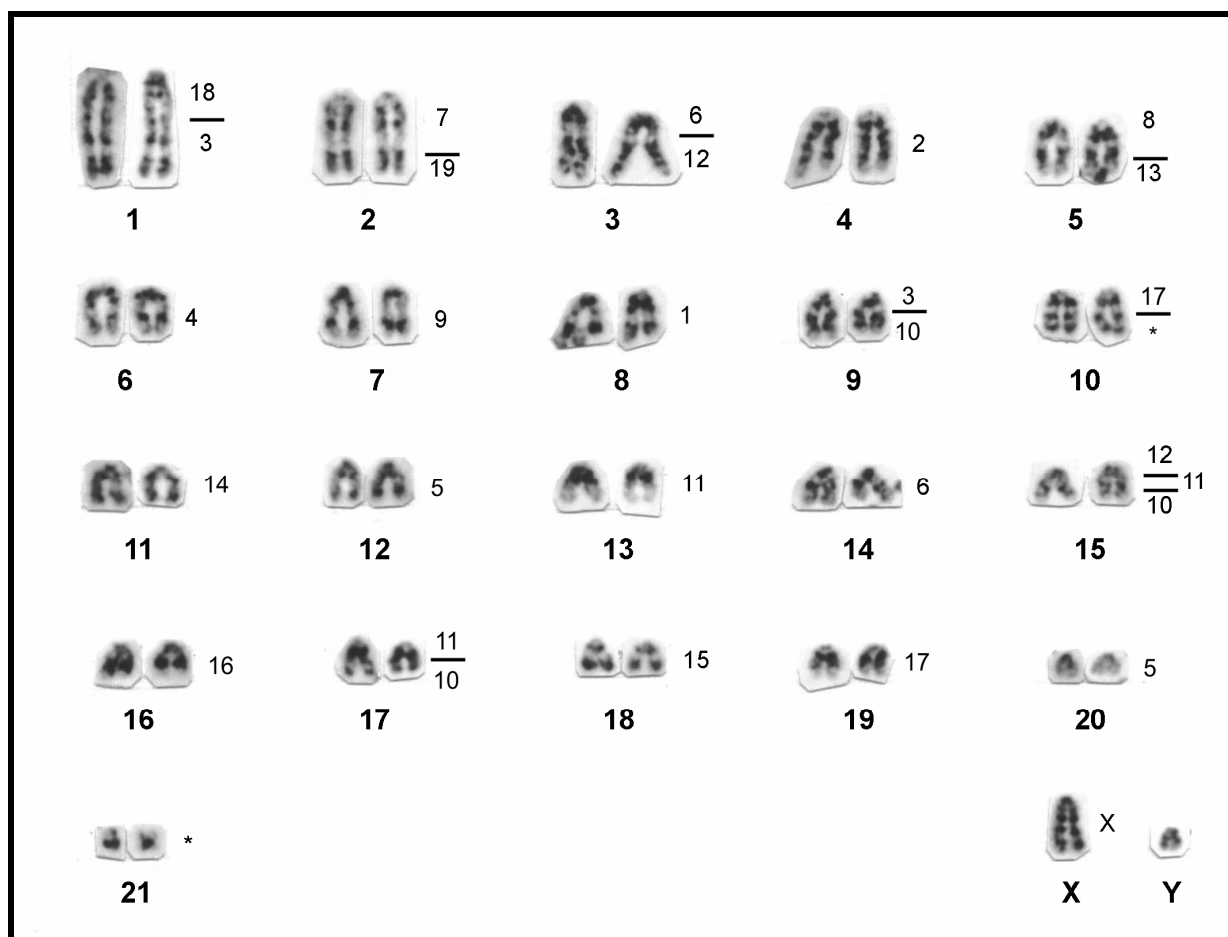


Figura 9 – Cariótipo em banda G de *Akodon paranaensis*, $2n = 44$ (conforme SBALQUEIRO, 1989), sendo os cromossomos numerados abaixo. A hibridação com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita. O asterisco denota regiões não hibridadas



3. 4. Hibridação entre *Mus musculus*, $2n = 40$, e *A. serrensis*, $2n = 46$

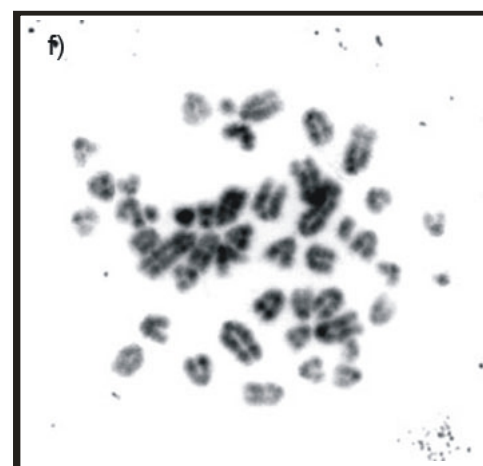
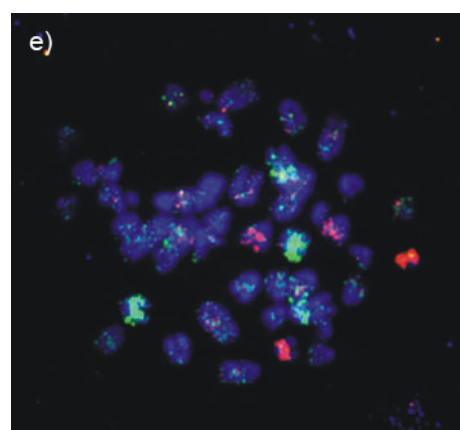
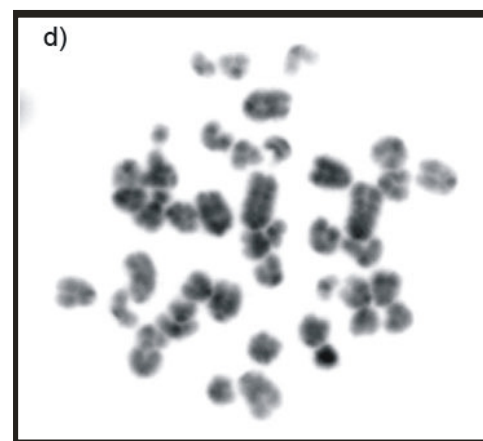
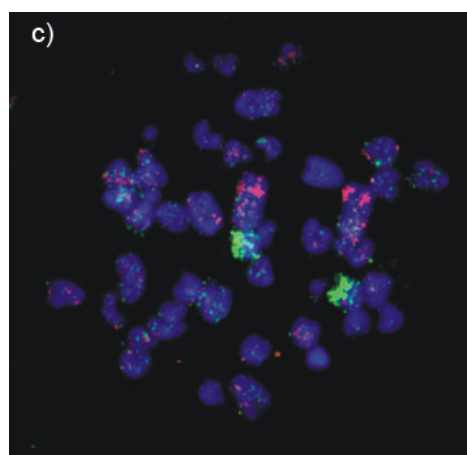
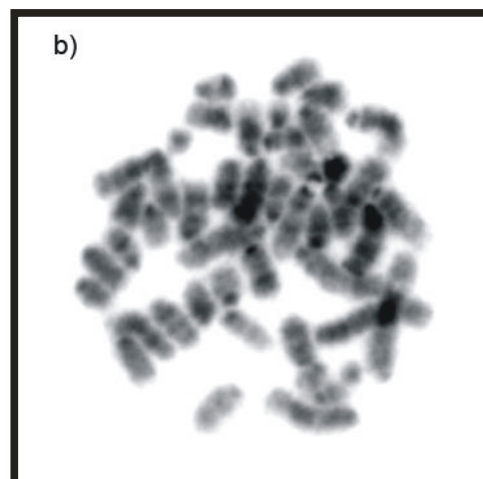
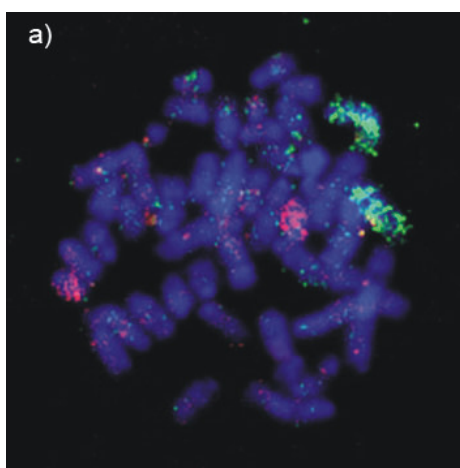
As hibridações entre *Mus musculus* e *A. serrensis* (ASE), mostraram-se satisfatórias. Foram utilizadas as sondas autossômicas cromossomo-específicas 1 a 19 mais as sondas específicas dos cromossomos sexuais X e Y de rato de laboratório para delimitar os segmentos homeólogos em *A. serrensis*. A sonda cromossomo-específica 10 não apresentou marcação em ASE. Já o cromossomo X hibridizou inteiramente com o X de ASE, o mesmo não ocorreu com o Y. As 20 sondas revelaram 25 regiões de homeologia no genoma de *A. serrensis* (Figura 10 – a a t)). Os cromossomos dos pares 7 e 22 de ASE não hibridaram.

Esta espécie apresentou quatro associações: 3/18, 6/12, 7/19 e 8/13. Estas associações estão na Figura 11, e seguiram o mesmo padrão de descrição relatado em ACU, item 3.1.

O mapa das homeologias cromossômicas entre *Mus musculus* e *A. serrensis* são mostrados na Figura 11. Este apresenta o cariótipo de ASE com a numeração descrita por SBALQUEIRO (1989), sendo que ao lado de cada cromossomo estão delimitadas as regiões e/ou cromossomos hibridados pelas sondas de MMU, e as regiões onde não foram evidenciados sinais de hibridação estão representadas por asterisco.

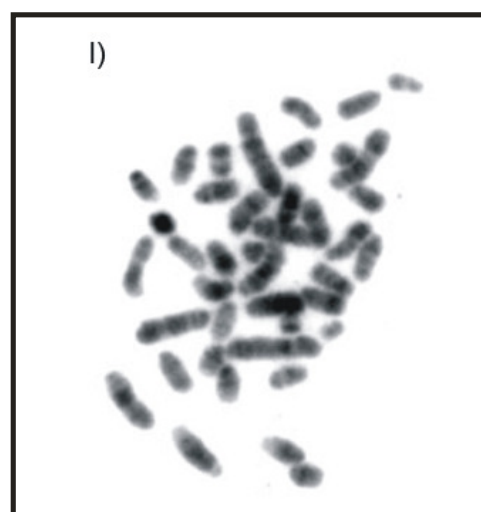
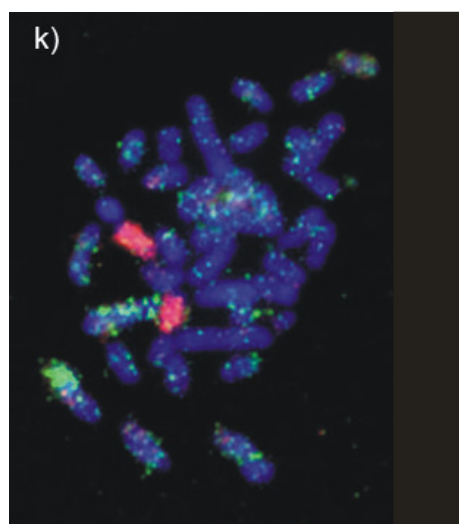
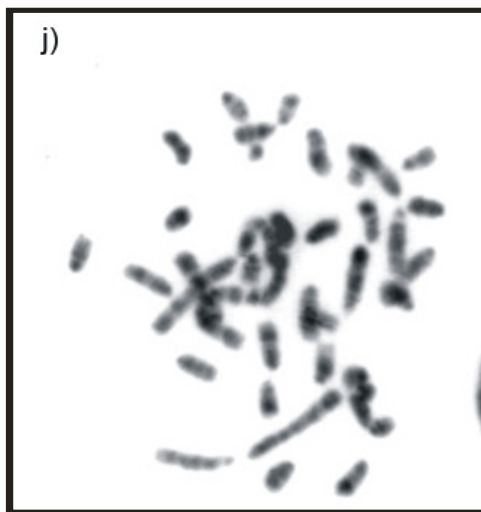
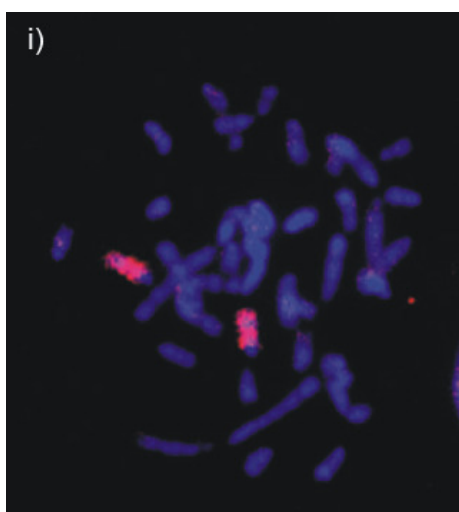
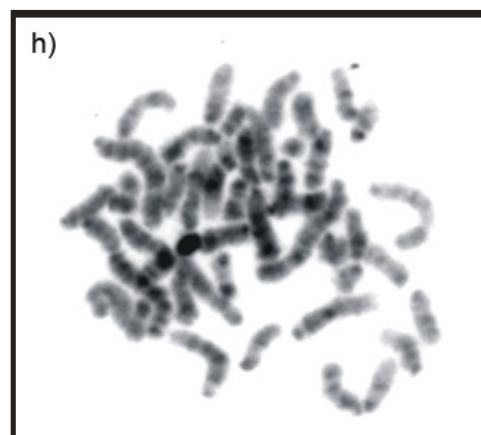
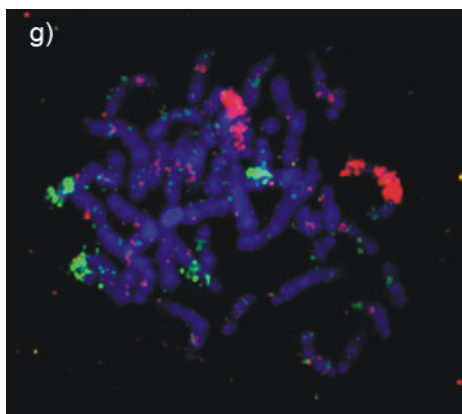
Figura 10 – a) a t): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Akodon serrensis*, $2n = 46$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em vermelho do cromossomo 3 e verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 5 e em verde do cromossomo 6; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



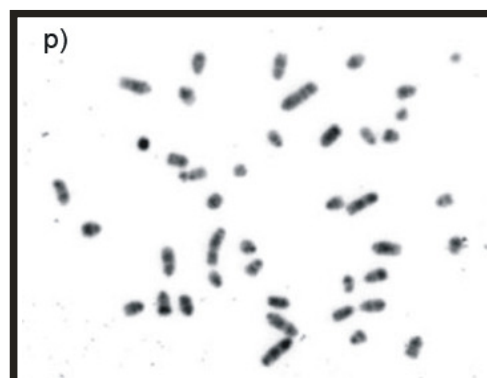
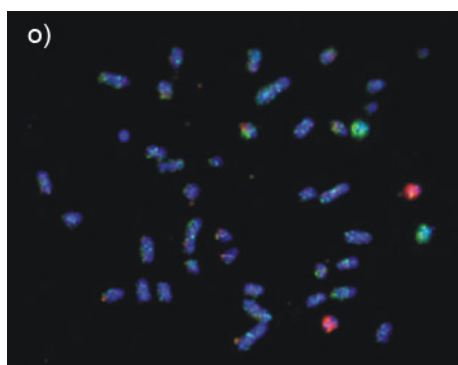
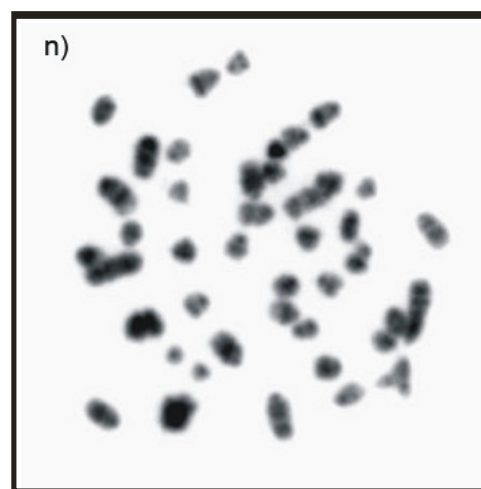
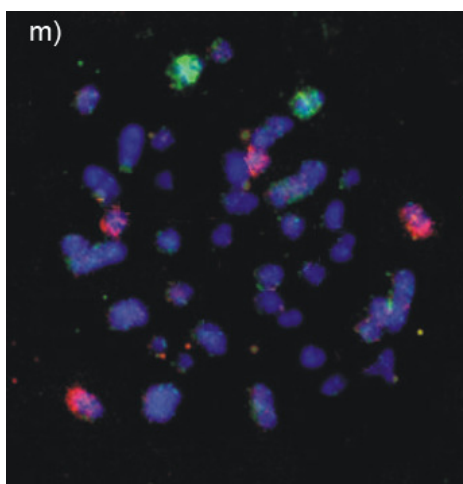
g) marcações em vermelho do cromossomo 7 e em verde do cromossomo 8; h) metáfase (g) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; i) marcações em vermelho do cromossomo 9; j) metáfase (i) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; k) marcações em vermelho do cromossomo 11 e em verde do cromossomo 12; l) metáfase (k) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



m) marcações em vermelho do cromossomo 13 e em verde do cromossomo 14; n) metáfase (m) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; o) marcações em vermelho do cromossomo 15 e em verde do cromossomo 16; p) metáfase (o) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



q) marcações em vermelho do cromossomo 17 e verde do cromossomo 18; r) metáfase (q) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; s) marcações em vermelho do cromossomo 19 e verde do cromossomo X; t) metáfase (s) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

conclusão

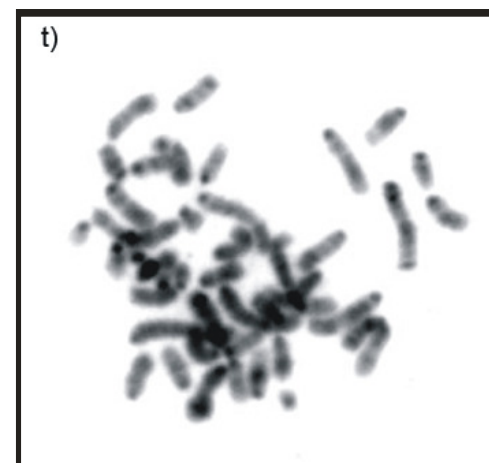
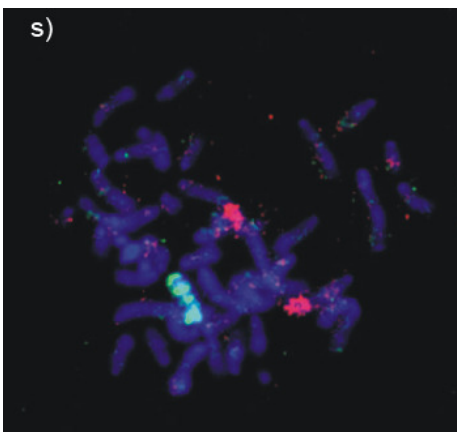
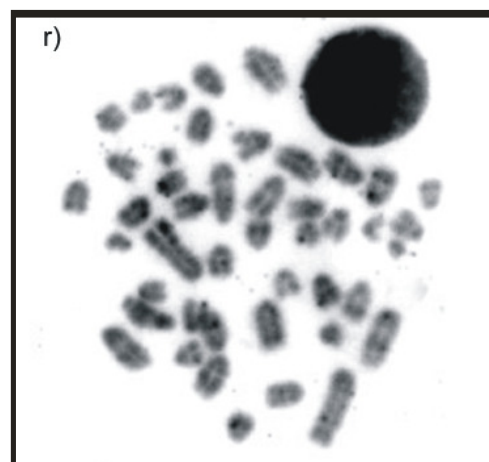
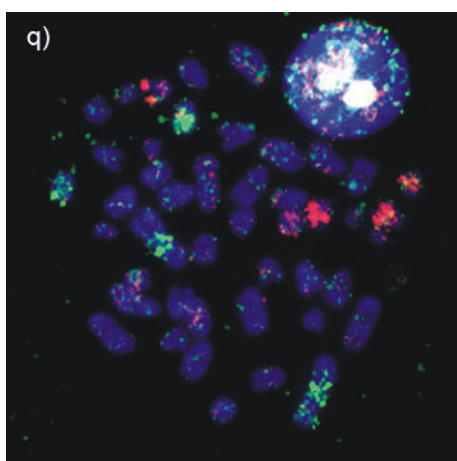
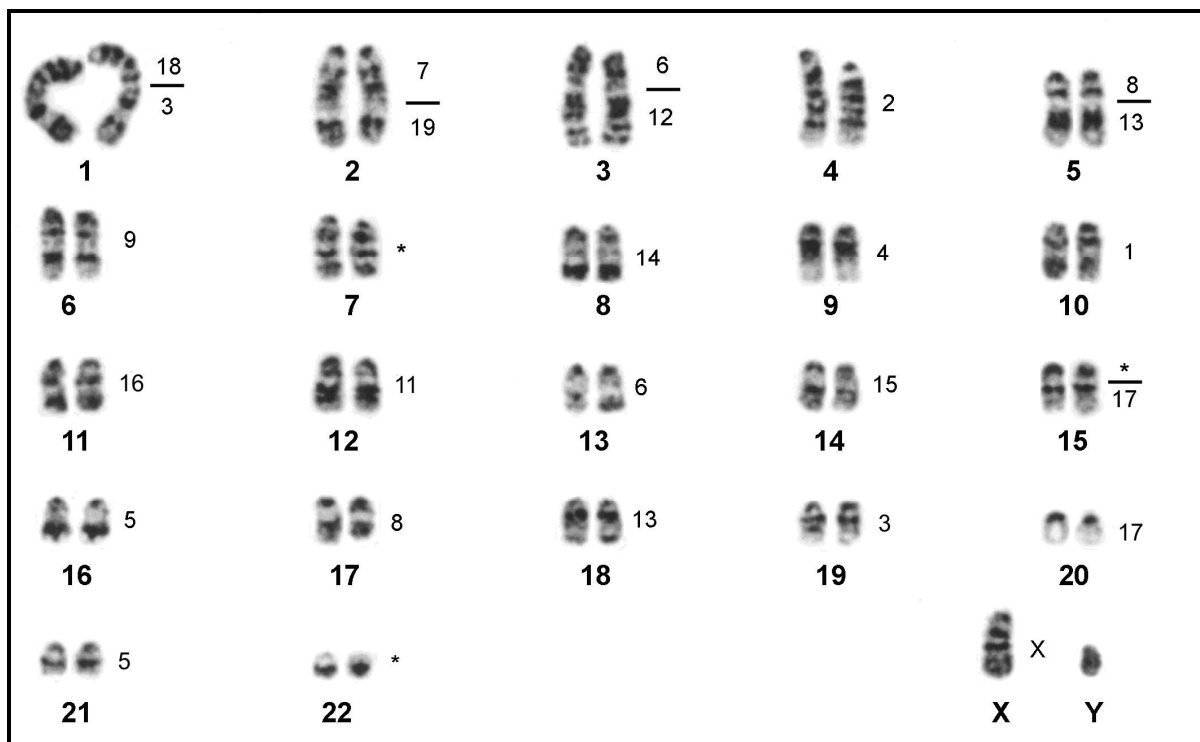


Figura 11 – Cariótipo em banda G de *Akodon serrensis*, $2n = 46$, onde os cromossomos de *A. serrensis* estão numerados abaixo (SBALQUEIRO, 1989). A hibridação com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita. O asterisco denota regiões não hibridadas



3. 5. Hibridação entre *Mus musculus*, $2n = 40$, e *Thaptomys nigrita* (TNI), $2n = 52$

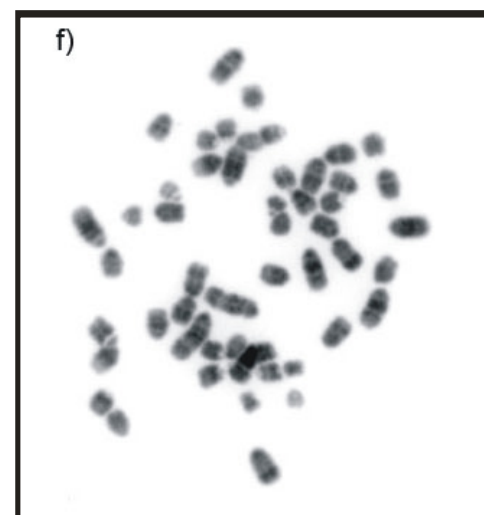
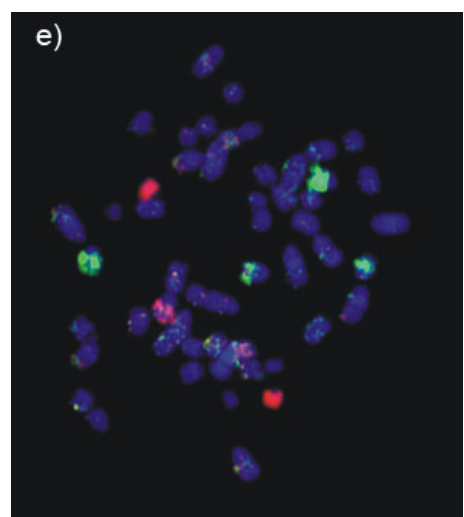
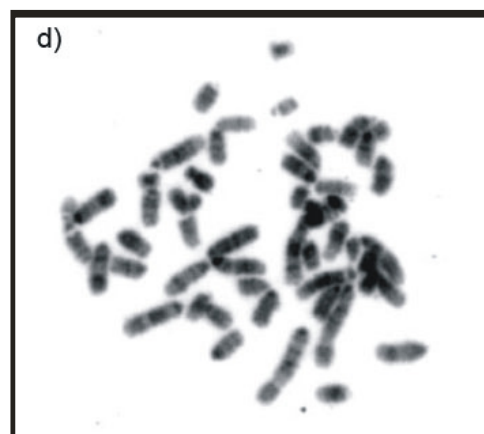
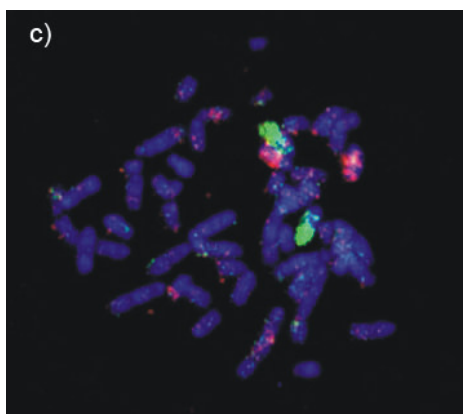
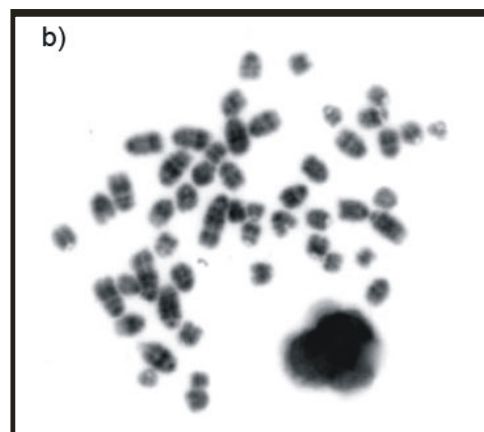
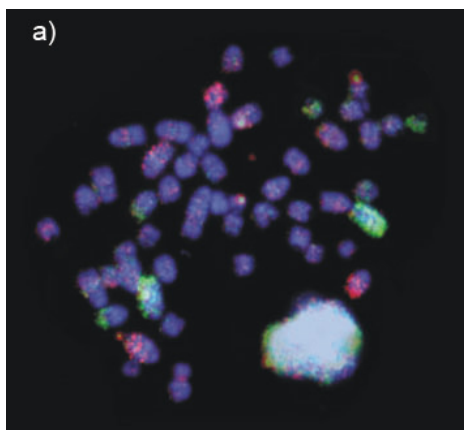
As hibridações entre *Mus musculus* e *T. nigrita* (TNI) mostraram-se satisfatórias. Foram utilizadas sondas cromossomo-específicas 1 a 19 mais as dos sexuais X e Y de rato de laboratório para delimitar os segmentos homeólogos em *T. nigrita*. O cromossomo X hibridizou inteiramente o cromossomo X de *A. nigrita*. As 20 sondas revelaram 32 regiões de homeologia no genoma de *T. nigrita* (Figura 12 – a) a t)). O par cromossômico 25 não foi hibridado por nenhuma sonda cromossômica de MMU.

Na espécie TNI foi verificada a presença de cinco associações: 2/10, 7/19, 8/13, 14/17 e 16/17. Estas associações estão na Figura 13, e seguiram o mesmo padrão de descrição que em ACU, item 3.1.

O mapeamento das homeologias cromossômicas entre *Mus musculus* e *T. nigrita* são mostrados na Figura 13. Este mapa cromossômico apresenta o conjunto cromossômico de *T. nigrita* com a numeração segundo SBALQUEIRO (1989). Ao lado de cada cromossomo estão delimitadas as regiões e/ou cromossomos hibridados pelas sondas de MMU, as regiões onde não foram evidenciados sinais de hibridação estão representadas por asterisco. A sua elaboração ocorreu após a realização dos experimentos de hibridação em TNI.

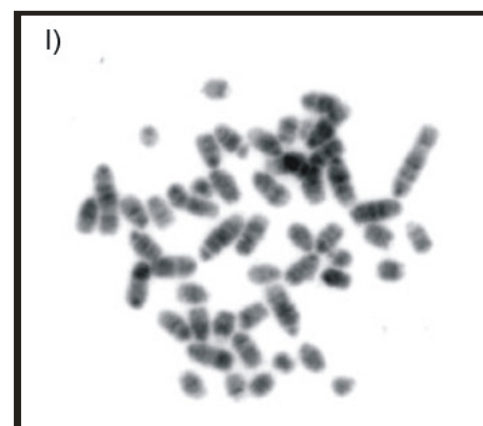
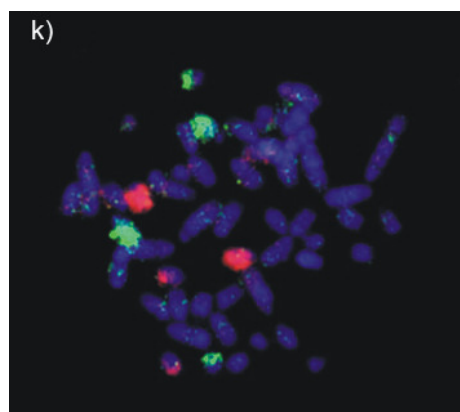
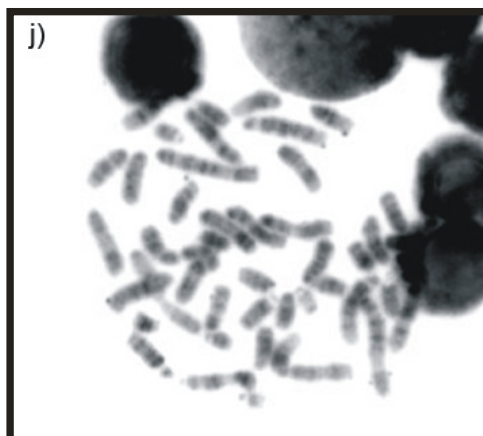
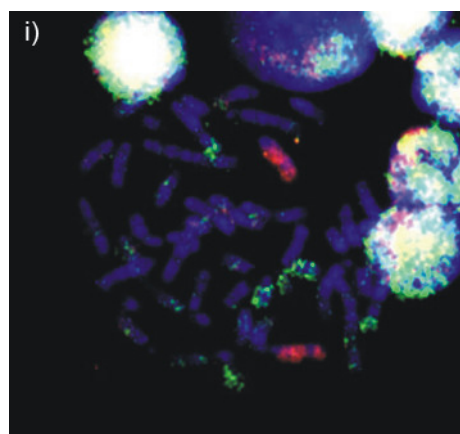
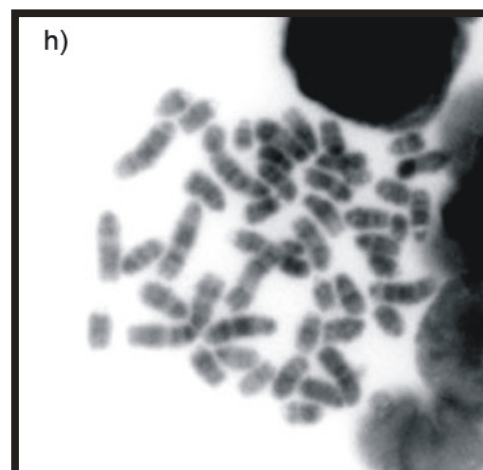
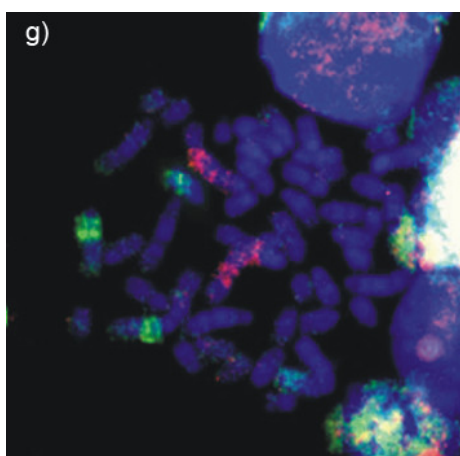
Figura 12 – a) a t): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Thaptomys nigrita*, $2n = 52$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em vermelho do cromossomo 3 e em verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 5 e em verde do cromossomo 6; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



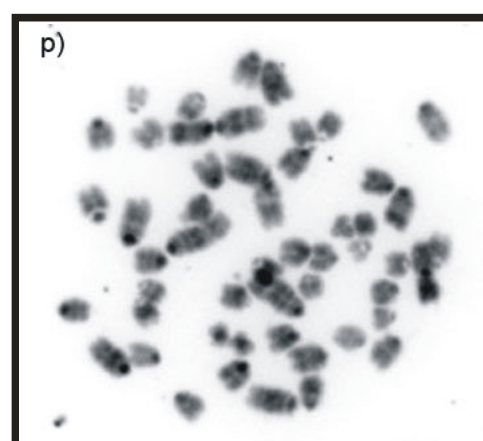
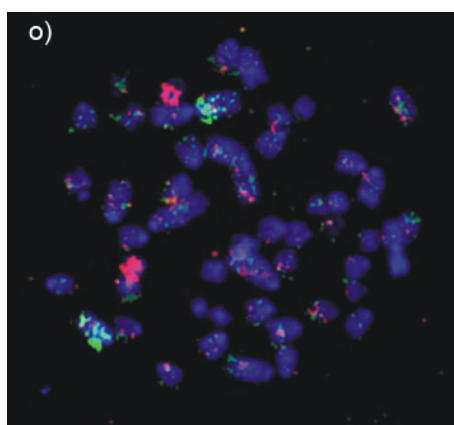
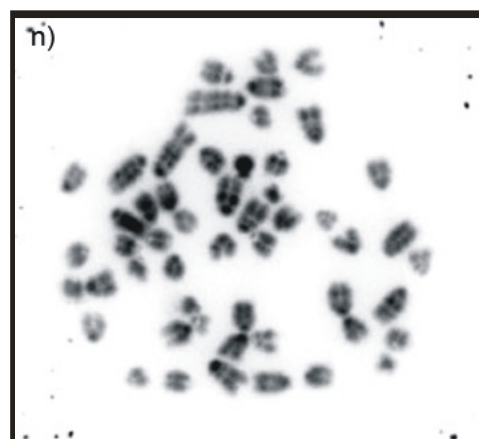
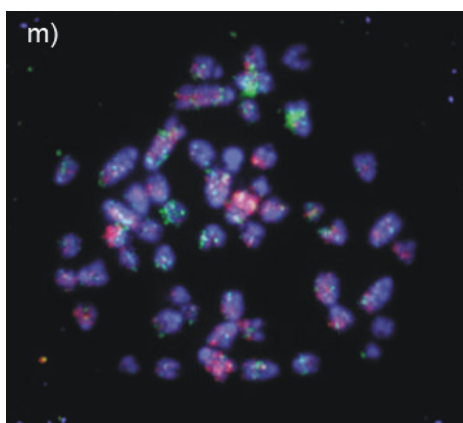
g) marcações em vermelho do cromossomo 7 e em verde do cromossomo 8; h) metáfase (g) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; i) marcações em vermelho do cromossomo 9 e em verde do cromossomo 10; j) metáfase (i) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; k) marcações em vermelho do cromossomo 11 e em verde do cromossomo 12; l) metáfase (k) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



m) marcações em vermelho do cromossomo 13 e em verde do cromossomo 14; n) metáfase (m) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; o) marcações em vermelho do cromossomo 15 e em verde do cromossomo 16; p) metáfase (o) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; q) marcações em vermelho do cromossomo 17 e em verde do cromossomo 18; r) metáfase (q) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



q) marcações em vermelho do cromossomo 17 e em verde do cromossomo 18; r) metáfase(q) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; s) marcações em vermelho do cromossomo 19 e em verde do cromossomo X; t) metáfase (s) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI

conclusão

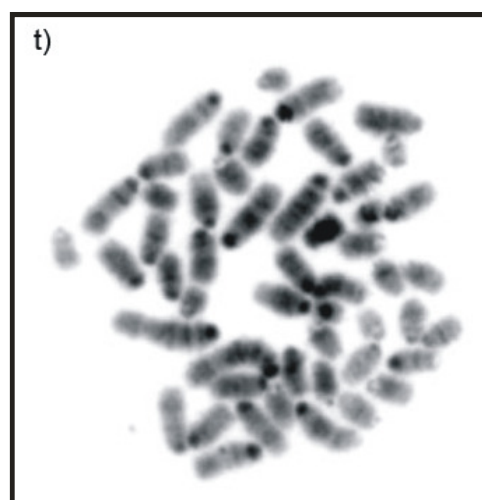
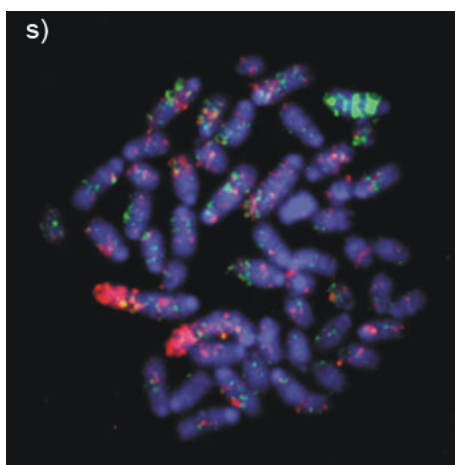
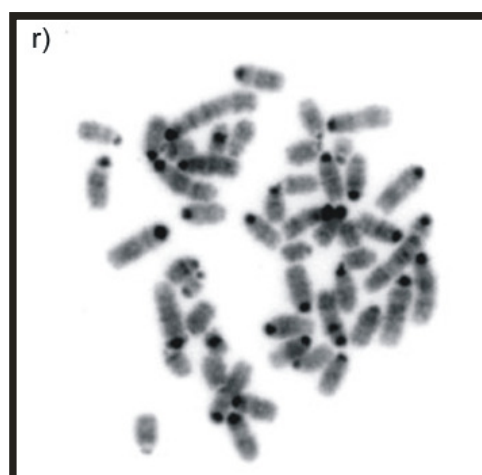
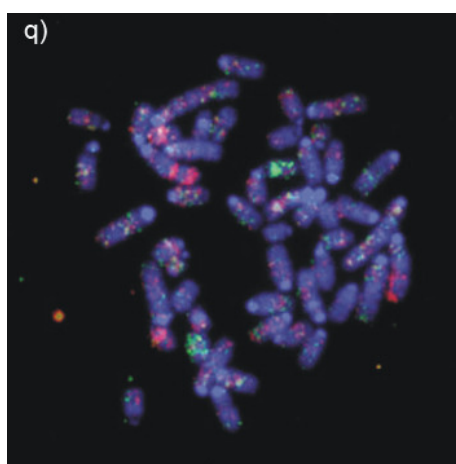
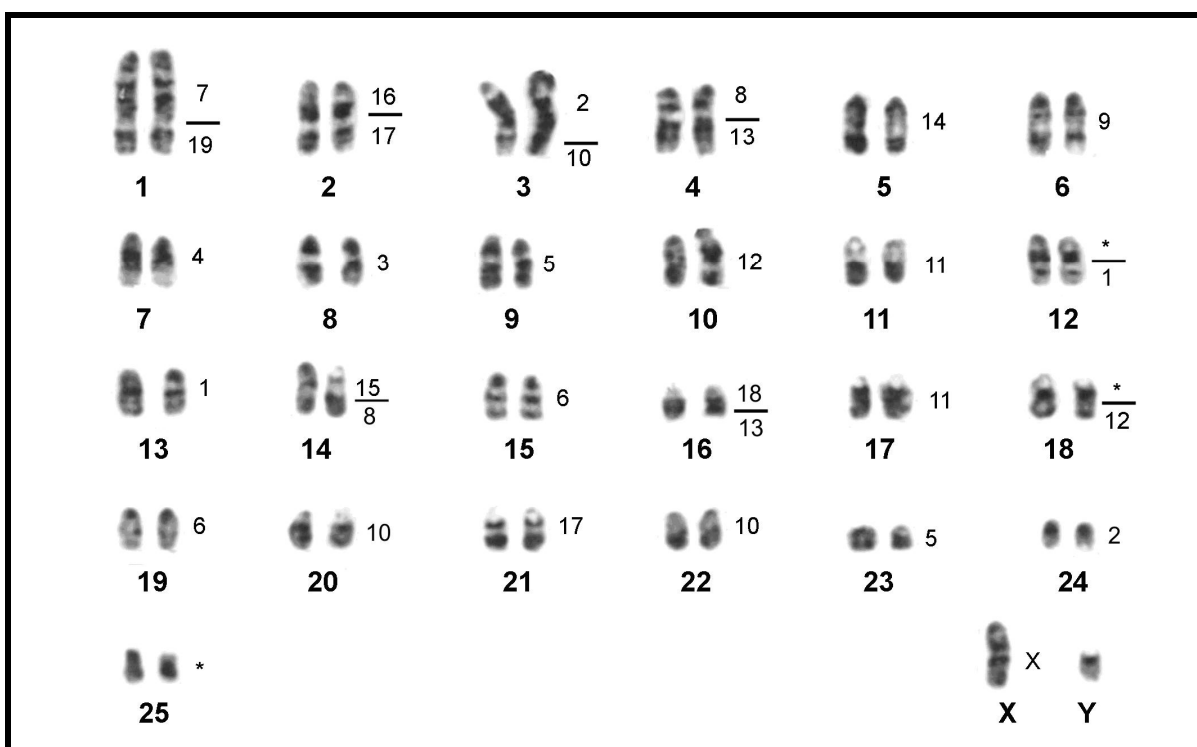


Figura 13 – Cariótipo em banda G de *Thaptomys nigrita*, $2n = 52$, onde os cromossomos de *T. nigrita* estão numerados abaixo conforme a nomenclatura proposta por SBALQUEIRO (1989). As hibridações com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita



3. 6 . Hibridação entre *Mus musculus*, $2n = 40$, e *Necromys lasiurus*, $2n = 34$

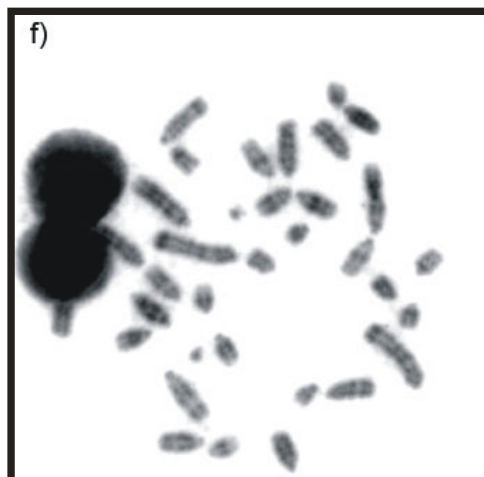
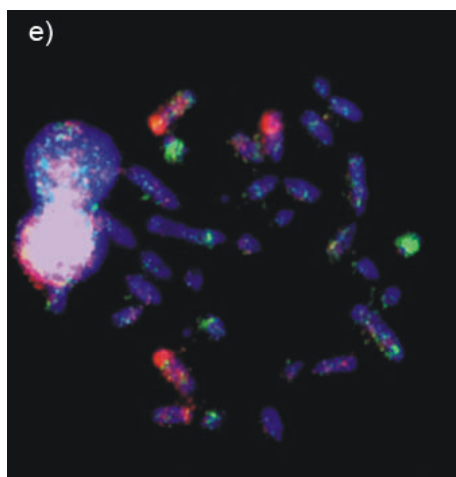
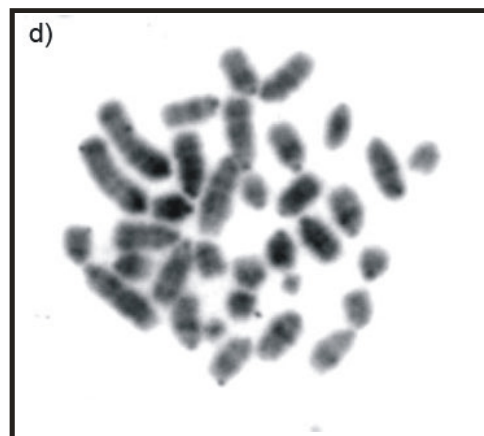
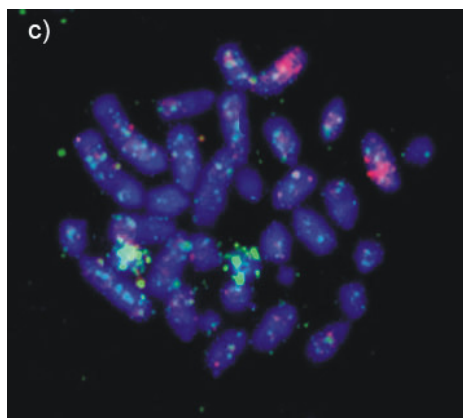
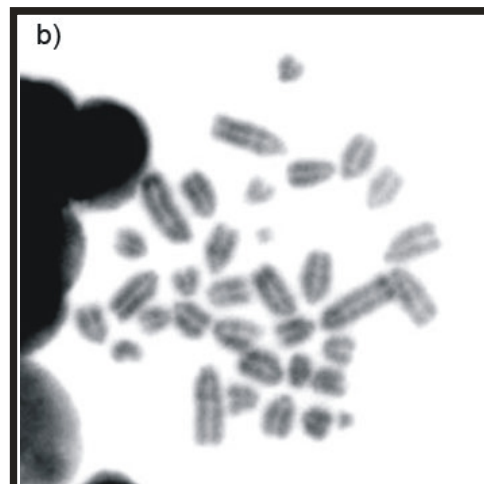
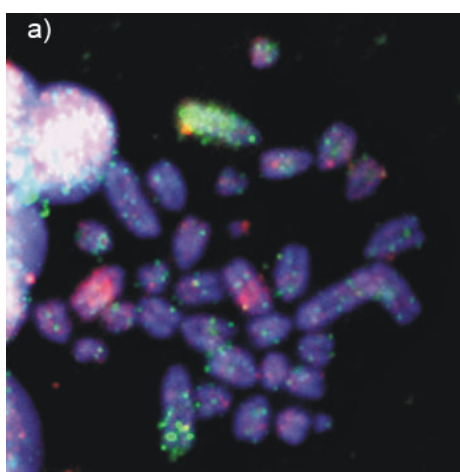
As hibridações entre *Mus musculus* e *N. lasiurus* (NLA), mostraram-se satisfatórias. Foram utilizadas sondas cromossomo-específicas 1 a 19 mais as dos sexuais X e Y de rato de laboratório para delimitar os segmentos homeólogos em NLA. Já o cromossomo X hibridizou inteiramente o X de NLA. As 19 sondas autossômicas, mais a sonda X revelaram 29 regiões de homeologia no genoma de NLA, sendo que todos os cromossomos de NLA foram hibridados por pelo menos uma sonda cromossômica de MMU (Figura 14 – a) a v)).

Como resultado das hibridações em NLA foram identificadas 14 associações: 1/5, 3/18, 5/7, 5/10, 6/9, 6/12, 7/19, 8/13, 8/17, 9/14, 10/16, 11/15, 5/7/19 e 6/9/14. Estas associações encontram-se na Figura 15, e seguiram o mesmo padrão de descrição relatado em ACU, item 3.1.

O mapeamento das homeologias cromossômicas entre *Mus musculus* e *N. lasiurus* são mostrados na Figura 15. Este mapa cromossômico apresenta o conjunto cromossômico de *N. lasiurus* com a numeração segundo MAIA; LANGUTH (1981). Ao lado de cada cromossomo estão delimitadas as regiões e/ou cromossomos hibridados pelas sondas de MMU, as regiões onde não foram evidenciados sinais de hibridação estão representadas por asterisco. A sua elaboração ocorreu após a realização dos experimentos de hibridação em NLA.

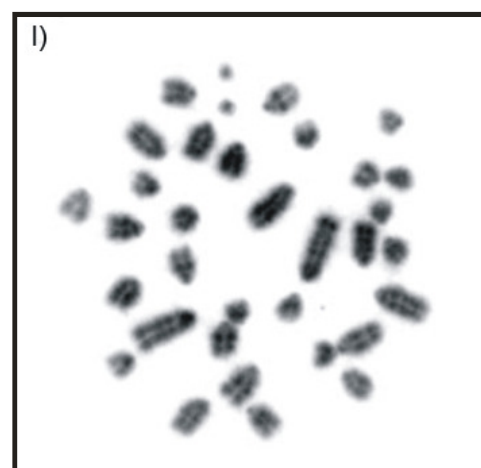
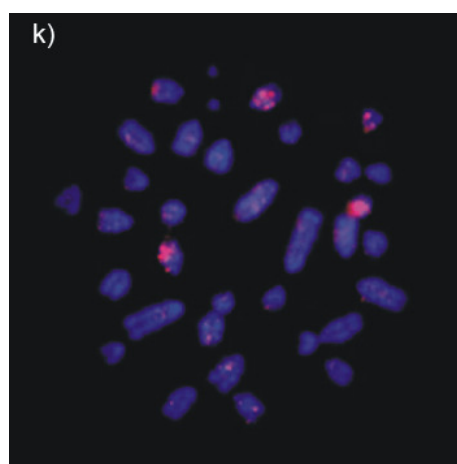
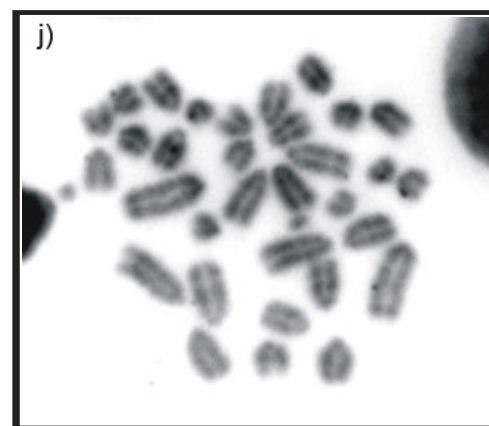
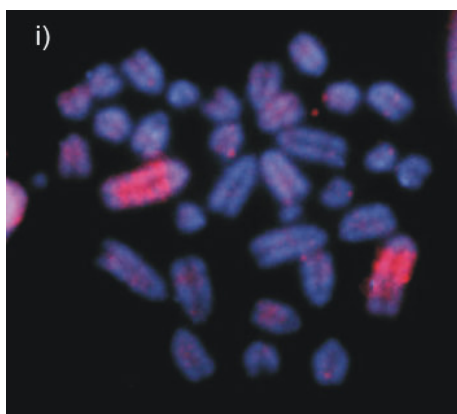
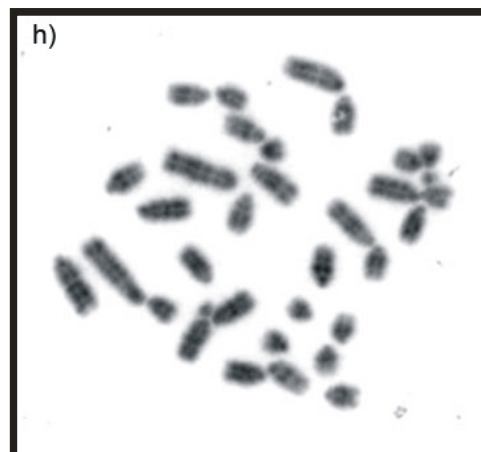
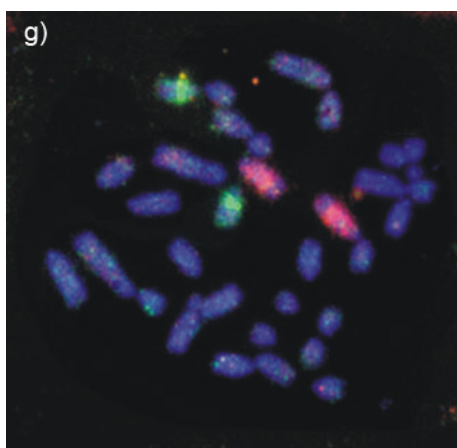
Figura 14 – a) a v): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Necromys lasiurus*, $2n = 34$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em vermelho do cromossomo 3 e em verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 5 e em verde do cromossomo 6; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



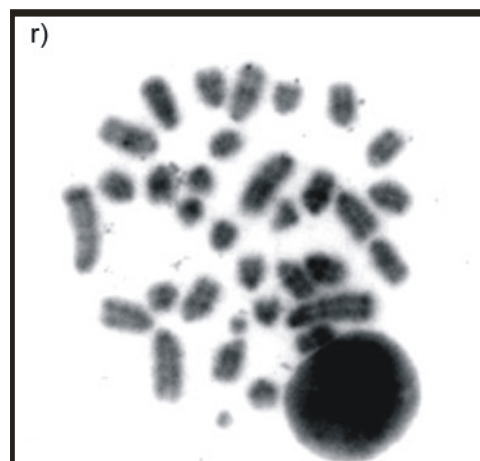
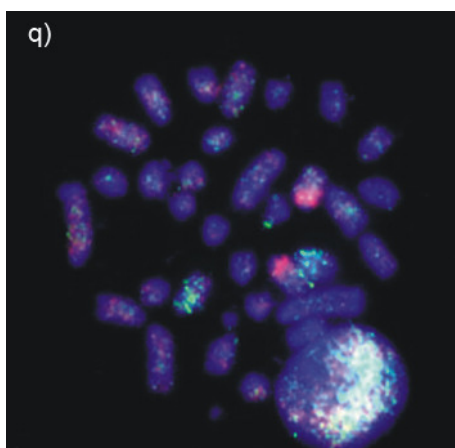
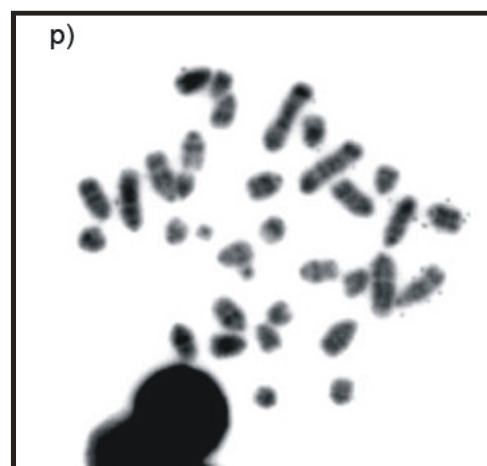
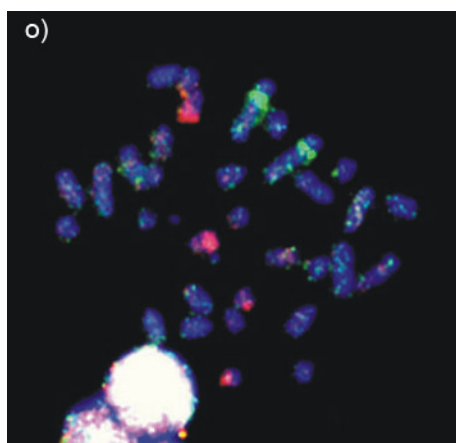
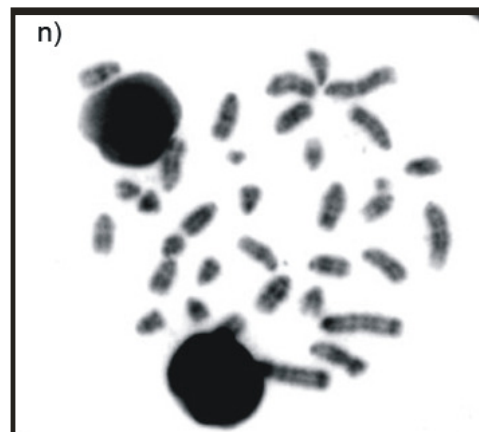
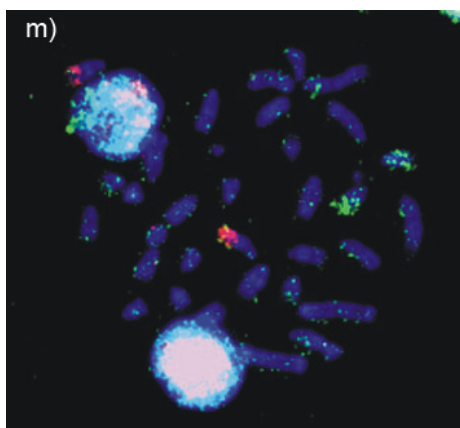
g) marcações em vermelho do cromossomo 7 e em verde do cromossomo 8; h) metáfase (g) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; i) marcações em vermelho do cromossomo 9; j) metáfase (i) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; k) marcações em verde do cromossomo 10; l) metáfase (k) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



m) marcações em vermelho do cromossomo 11 e em verde do cromossomo 12; n) metáfase (m) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; o) marcações em vermelho do cromossomo 13 e em verde do cromossomo 14; p) metáfase (o) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; q) marcações em vermelho do cromossomo 15 e em verde do cromossomo 16; r) metáfase (q) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



s) marcações em vermelho do cromossomo 17 e em verde do cromossomo 18; t) metáfase (s) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; u) marcações em vermelho do cromossomo 19 e em verde do cromossomo X; v) metáfase (u) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI

conclusão

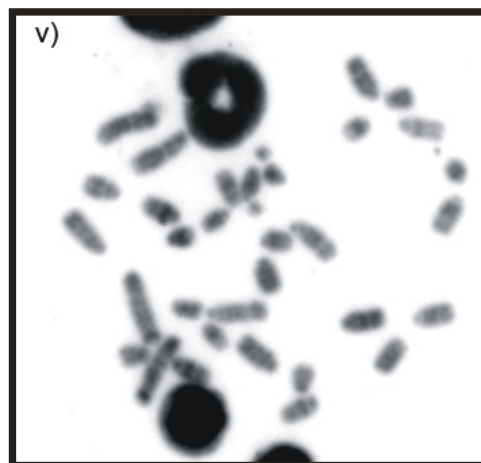
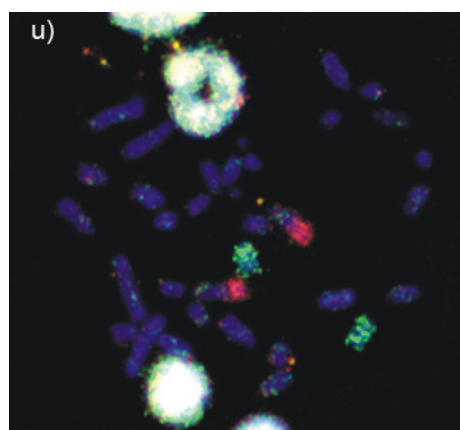
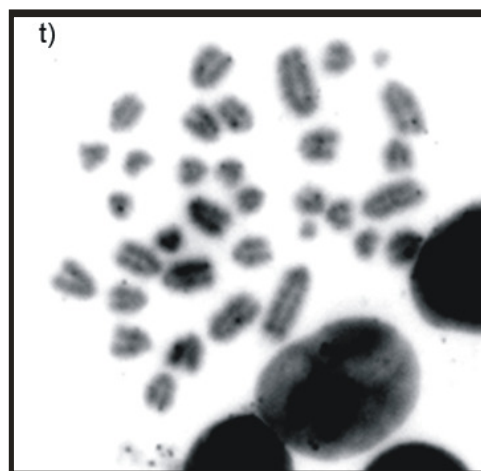
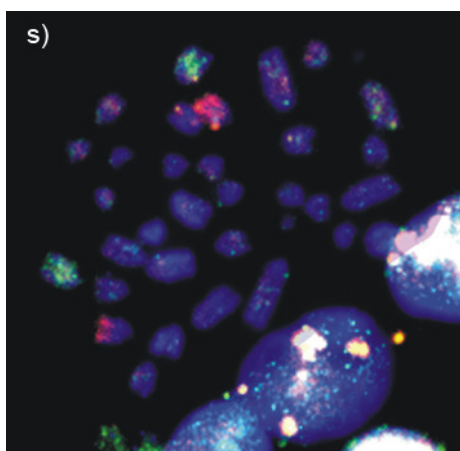
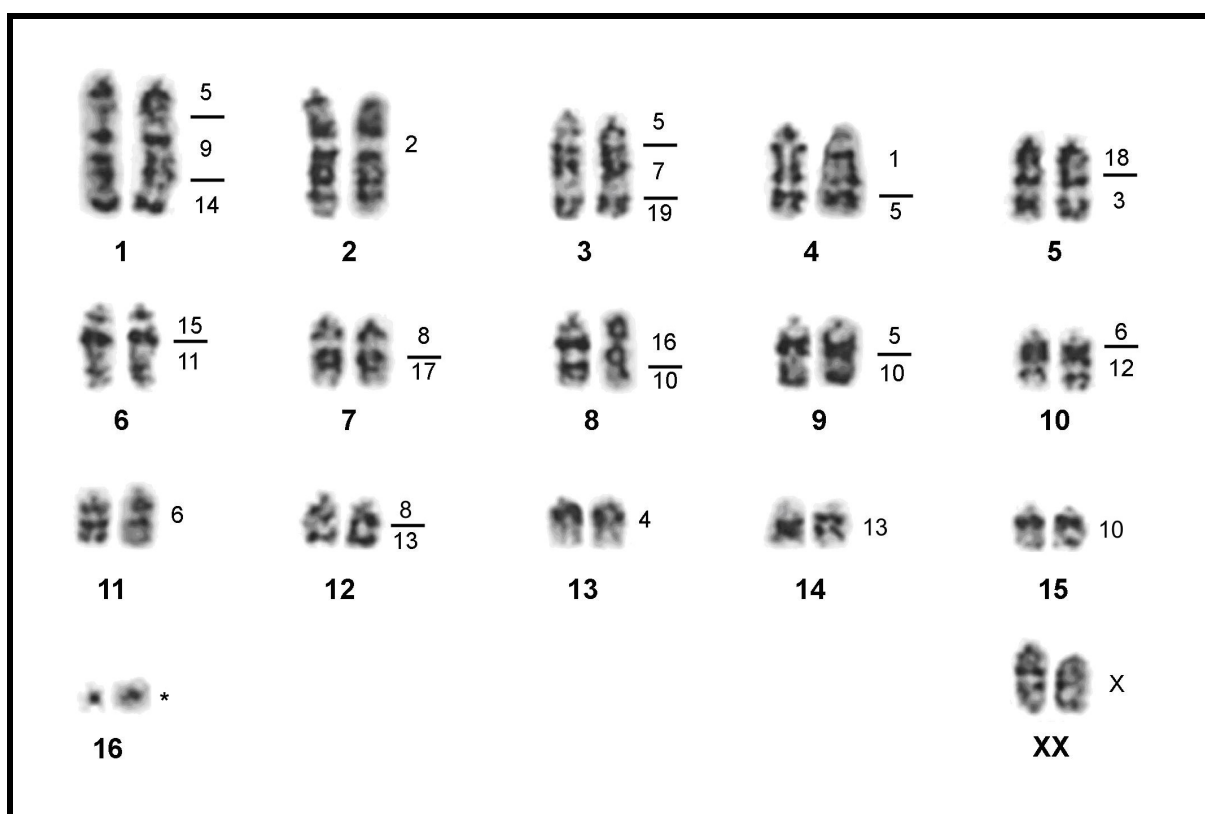


Figura 15 – Cariótipo em banda G de *Necromys lasiurus*, $2n = 34$ (SBALQUEIRO, 1989), onde os cromossomos de *N. lasiurus* estão numerados abaixo conforme nomenclatura proposta por MAIA;LANGUTH (1981). As hibridações com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita



3. 7. Hibridação entre *Mus musculus*, $2n = 40$, e *Brucepattersonius griserufenscens*, $2n = 52$

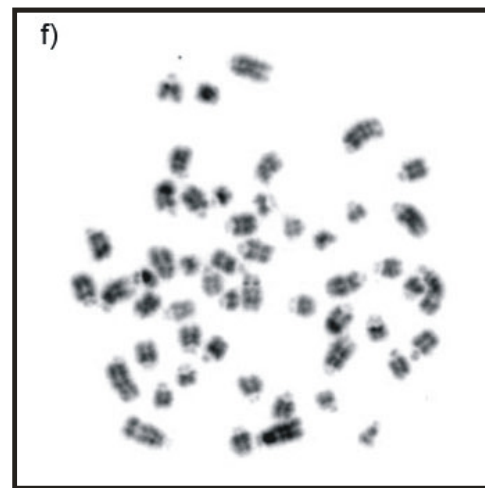
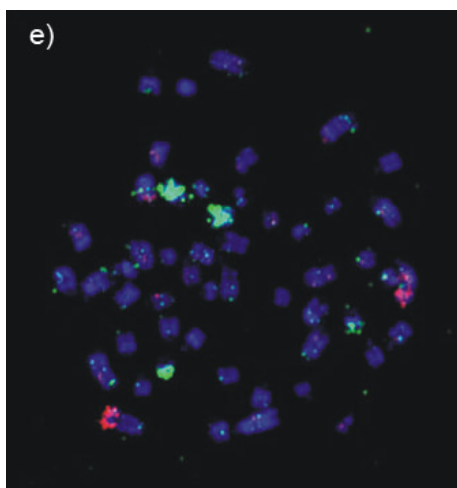
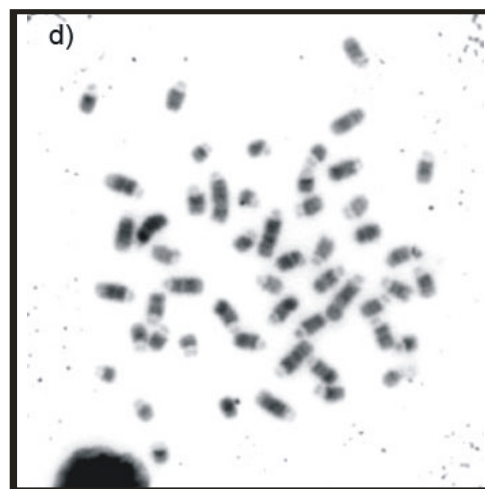
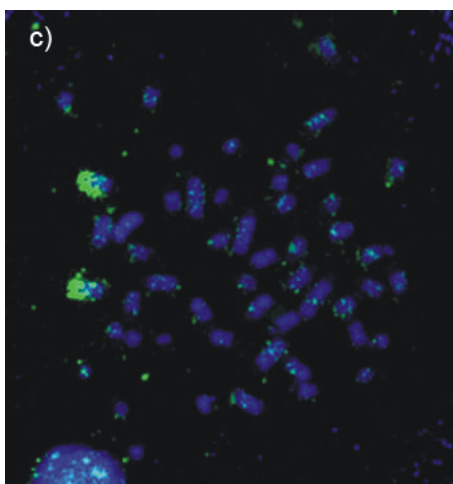
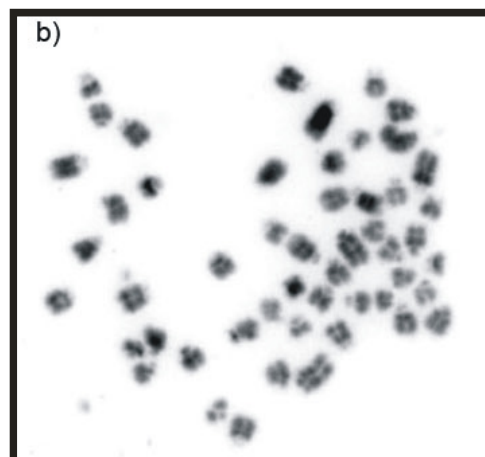
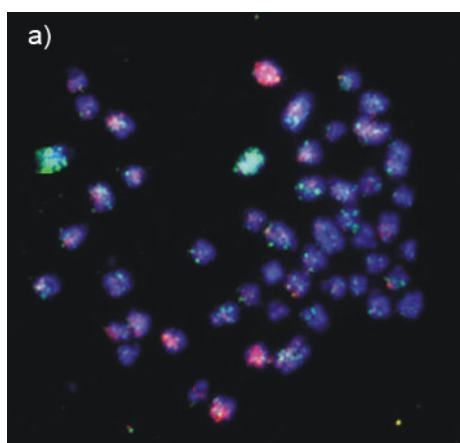
As hibridações entre *Mus musculus* e *Brucepattersonius griserufenscens* (BGR) mostraram-se satisfatórias. Foram utilizadas sondas cromossomo-específicas 1 a 19 mais as dos sexuais X e Y de MMU, tendo delimitado 27 segmentos homeólogos em *Brucepattersonius griserufenscens* (Figura 16 – a) a z)). A sonda 18 não apresentou homeologia em BGR, ao passo que o X hibridou inteiramente o cromossomo X de BGR. Os pares cromossômicos 19 e 25 não apresentaram nenhum sinal de hibridação com as sondas de MMU.

Esta espécie apresentou três associações que são: 4/8, 5/13 e 7/19. Estas associações estão representadas na Figura 17, e seguiram o mesmo padrão de descrição verificada em ACU, item 3.1.

O mapa contendo as homeologias cromossômicas entre *Mus musculus* e *Brucepattersonius griserufenscens* está mostrado na Figura 17. Este mapa apresenta o conjunto cromossômico de *Brucepattersonius griserufenscens* com a numeração segundo SBALQUEIRO (1989). Ao lado de cada cromossomo estão delimitadas as regiões e/ou cromossomos hibridados pelas sondas de MMU, as regiões onde não foram evidenciados sinais de hibridação estão representadas por asterisco. A sua elaboração ocorreu após a realização dos experimentos de hibridação em BGR.

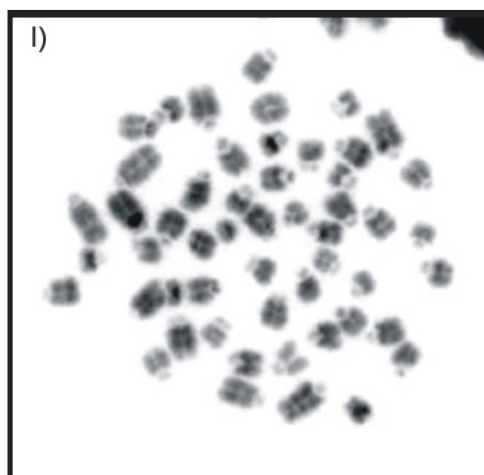
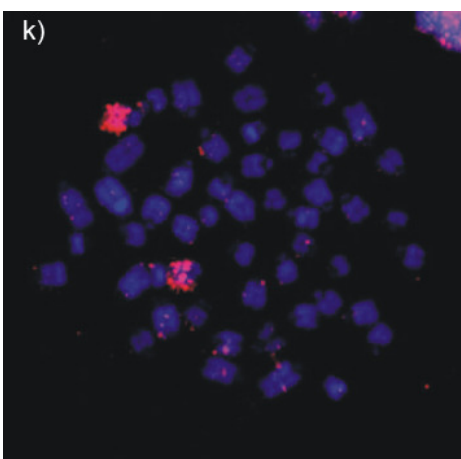
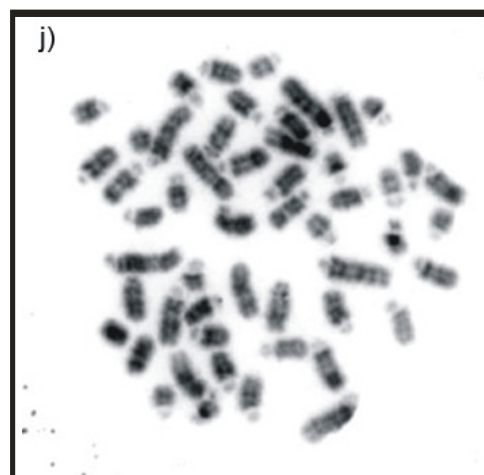
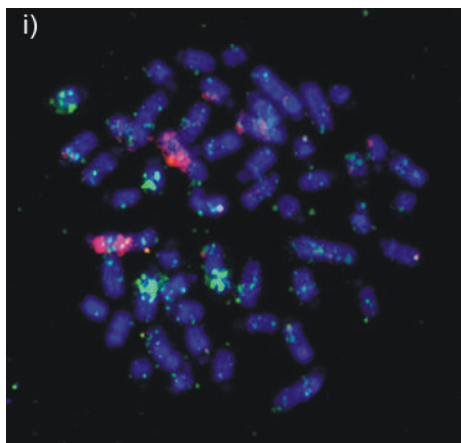
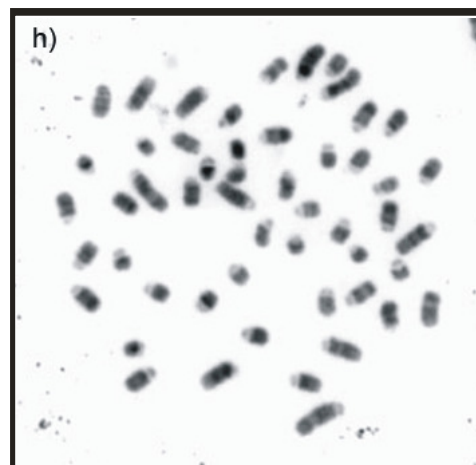
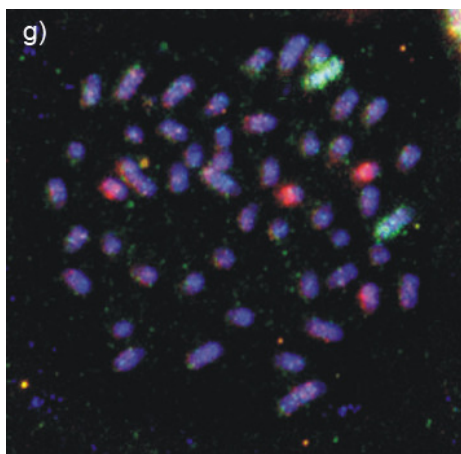
Figura 16 – a) a z): Híbridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Bucepattersonius griserufenscens*, $2n = 52$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 19 e em verde do cromossomo 3; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



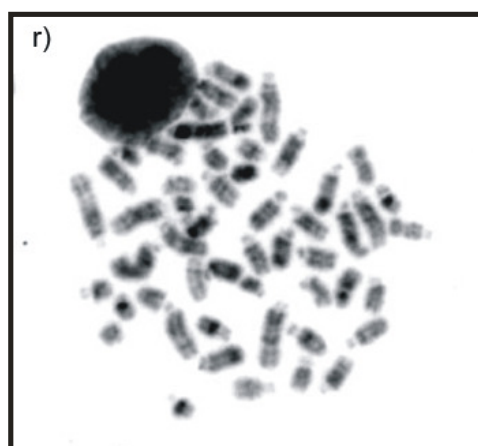
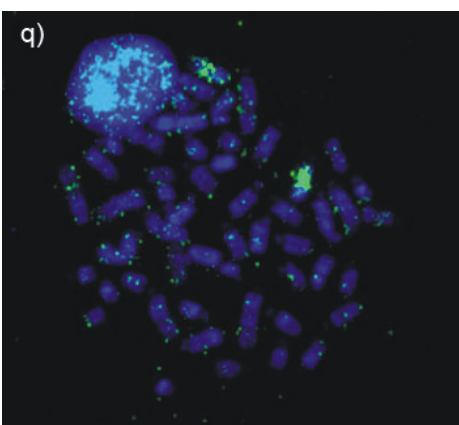
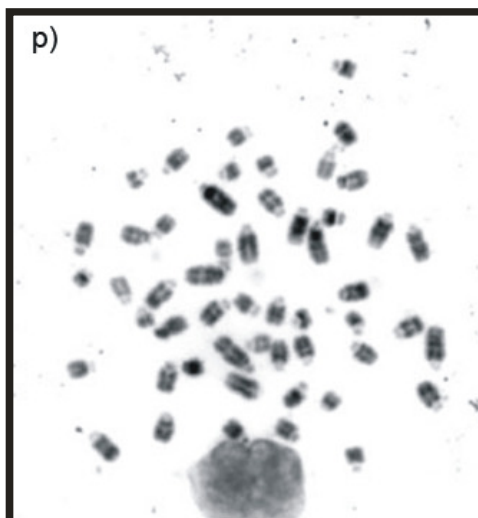
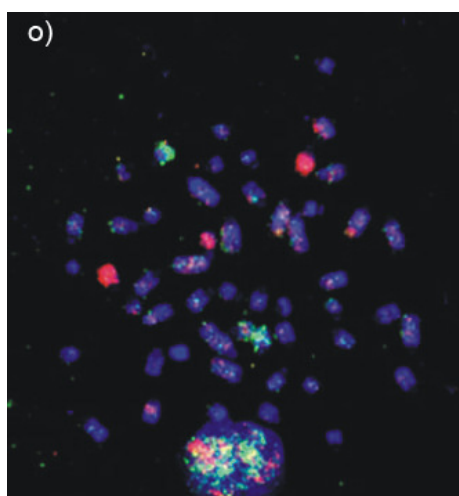
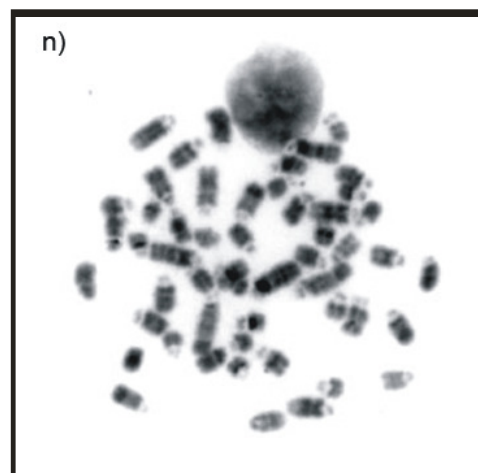
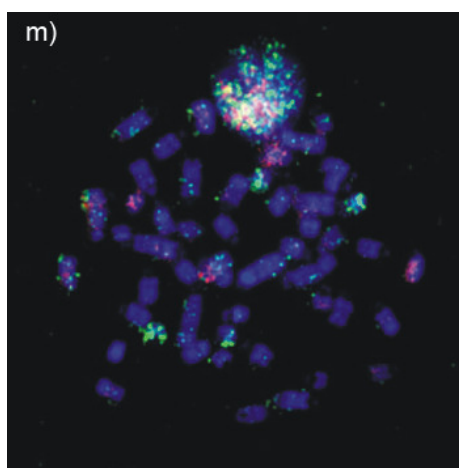
g) marcações em vermelho do cromossomo 5 e em verde do cromossomo 6; h) metáfase (g) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; i) marcações em vermelho do cromossomo 7 em verde do cromossomo 8; j) metáfase (i) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; k) marcações em vermelho do cromossomo 9; l) metáfase (k) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



m) marcações em vermelho do cromossomo 10 e em verde do cromossomo 17; n) metáfase (m) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; o) marcações em vermelho do cromossomo 11 e em verde do cromossomo 12; p) metáfase (o) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; q) marcações em verde do cromossomo 14; r) metáfase (q) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



s) marcações em vermelho do cromossomo 15; t) metáfase (s) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; u) marcações em vermelho do cromossomo 13 e em verde do cromossomo 16; v) metáfase (u) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; x) marcações em vermelho do cromossomo 19 e verde do cromossomo X; z) metáfase (x) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI

conclusão

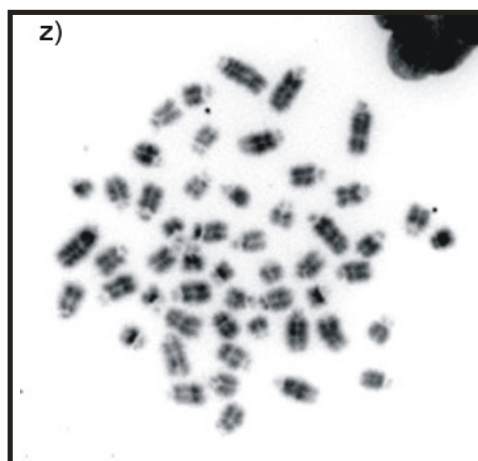
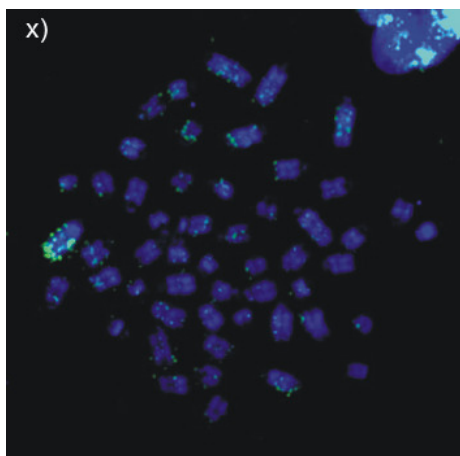
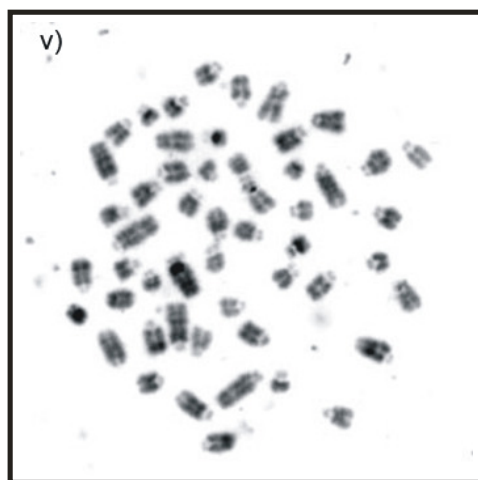
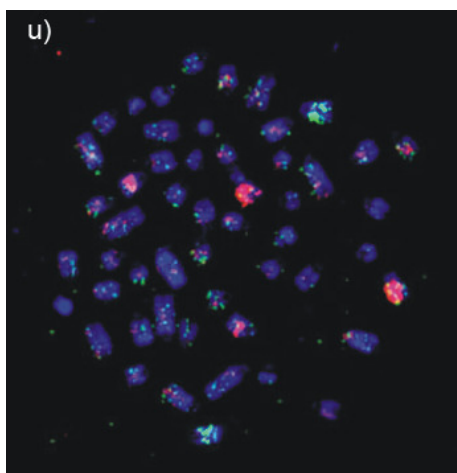
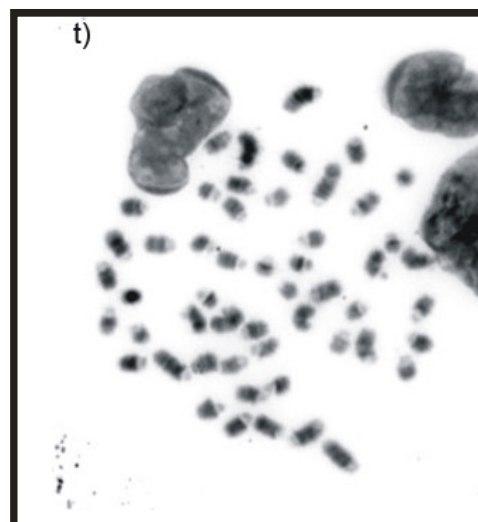
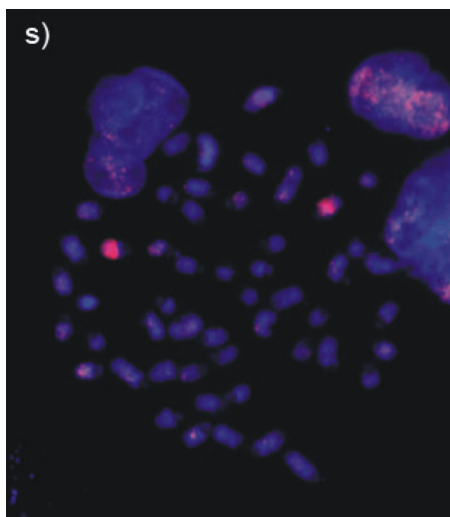
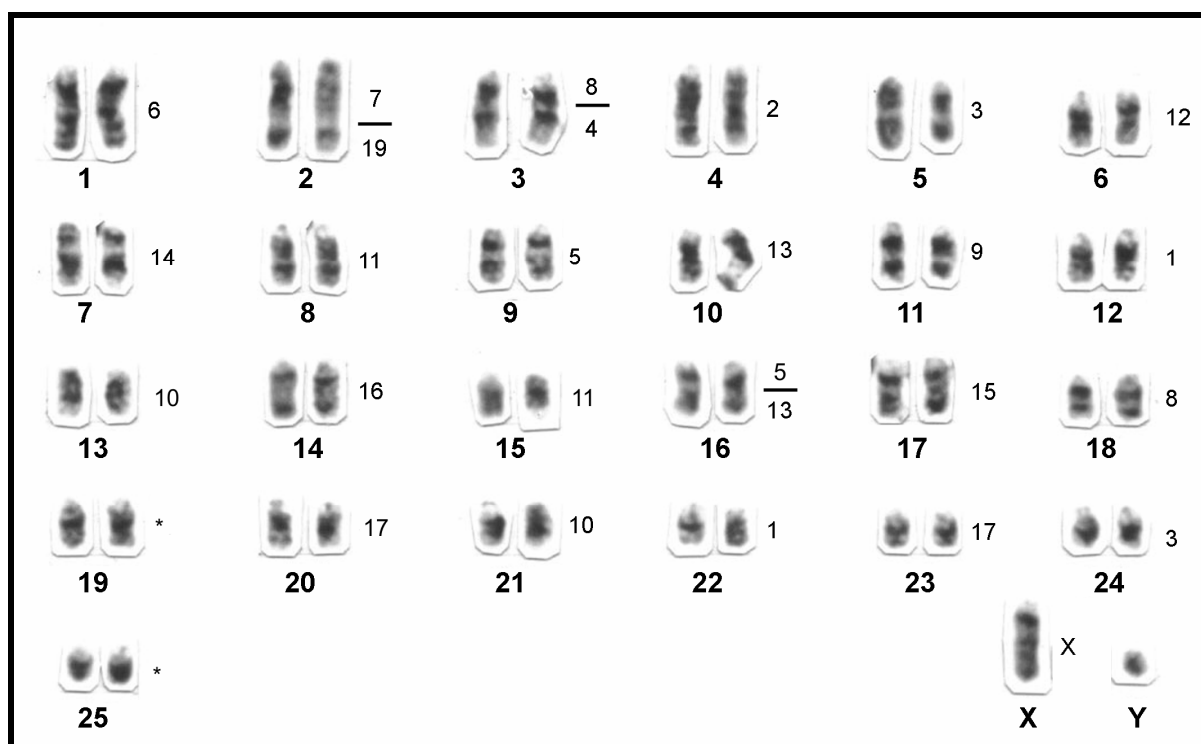


Figura 17 – Cariótipo em banda G de *Bucepattersonius griserufescens*, $2n = 52$, onde os cromossomos de BGR estão numerados abaixo, conforme a nomenclatura proposta por SBALQUEIRO (1989). A hibridação com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita. O asterisco denota regiões não hibridadas



3. 8. Hibridação entre *Mus musculus*, $2n = 40$, e *Oxymycterus* sp., $2n = 54$

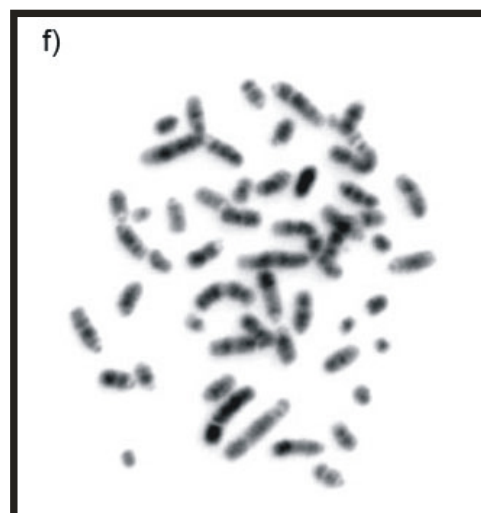
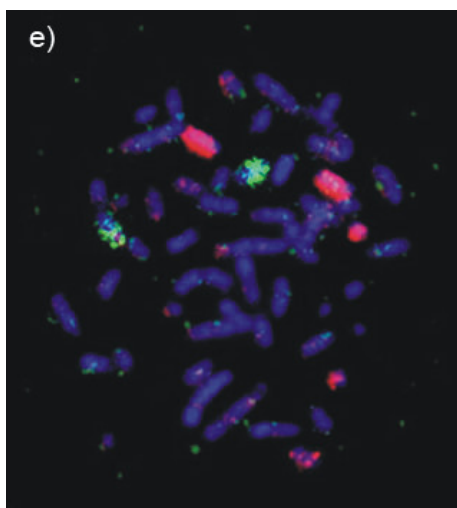
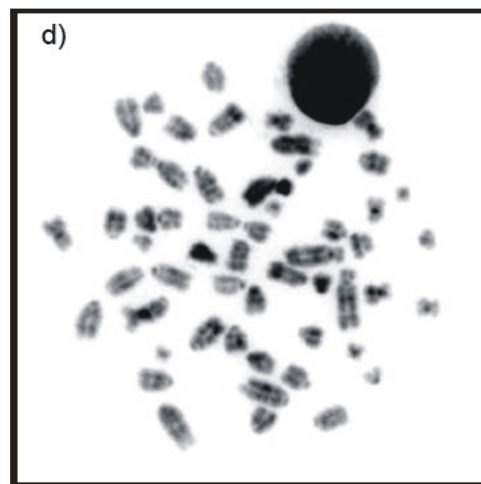
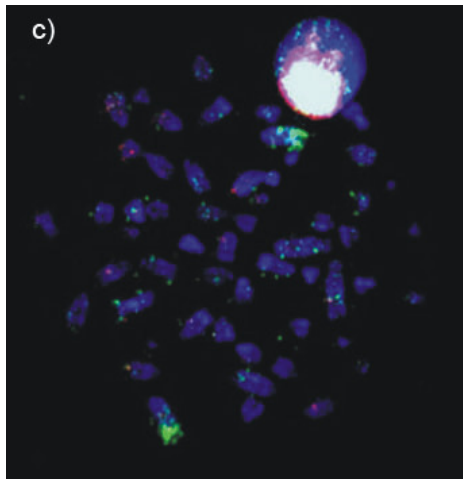
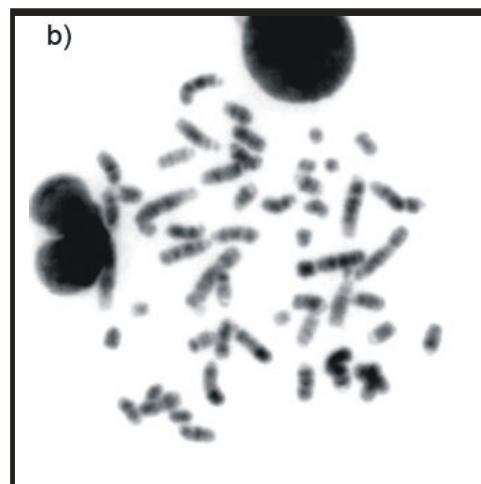
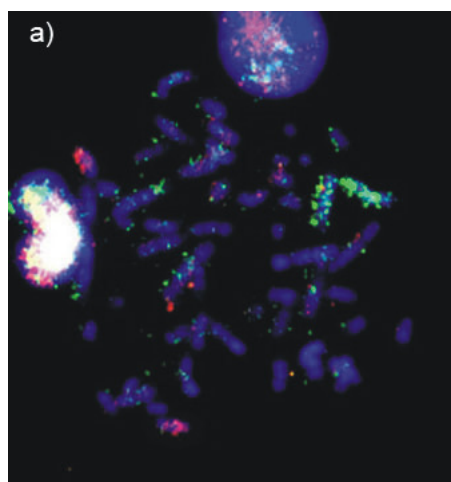
As hibridações entre *Mus musculus* e *Oxymycterus* sp. (OSP) mostraram-se satisfatórias. Foram utilizadas sondas cromossomo-específicas 1 a 19 mais as dos sexuais X e Y de rato de laboratório para delimitar os segmentos homeólogos em OSP. As sondas de MMU identificaram 32 regiões de homeologia com OSP e a sonda cromossômica X hibridou todo o braço q do cromossomo X de OSP (o braço curto é heterocromático) (Figura 18 – a) a v)). Apenas três segmentos cromossômicos de OSP não apresentaram sinal de hibridação, um segmento proximal no par 2, o braço p no par 18 e o braço p do cromossomo X de OSP.

Após a hibridação em OSP foram verificadas cinco associações cromossômicas, que são: 1/8, 3/10, 7/19, 8/13 e 10/16. Estas associações estão indicadas na Figura 19, e seguiram o mesmo padrão de descrição verificada em ACU, item 3.1.

O mapeamento das homeologias cromossômicas entre *Mus musculus* e *Oxymycterus* sp. são mostradas na Figura 19. Este mapa cromossômico apresenta o conjunto cromossômico de *Oxymycterus* sp. Numerado conforme SBALQUEIRO (1989). Ao lado de cada cromossomo estão delimitadas as regiões e/ou cromossomos hibridados pelas sondas de MMU, as regiões onde não foram evidenciados sinais de hibridação estão representadas por asterisco.

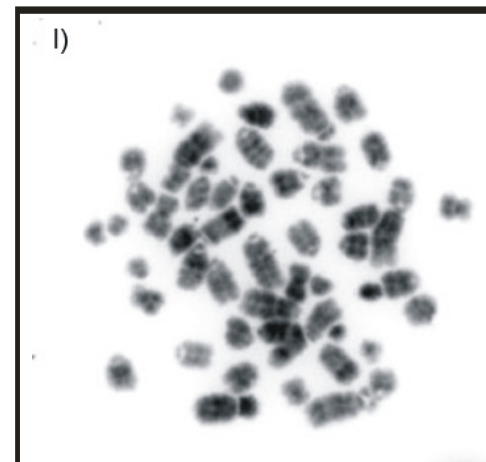
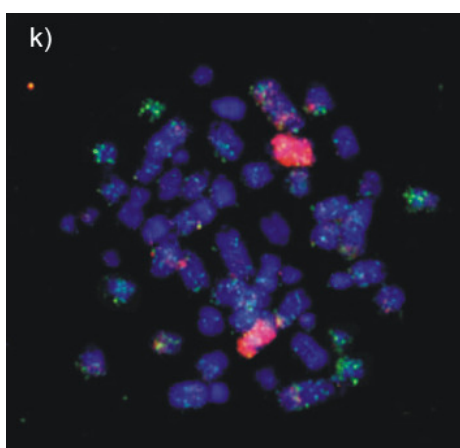
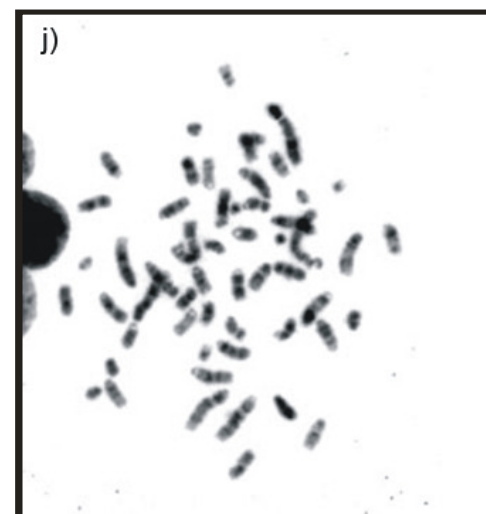
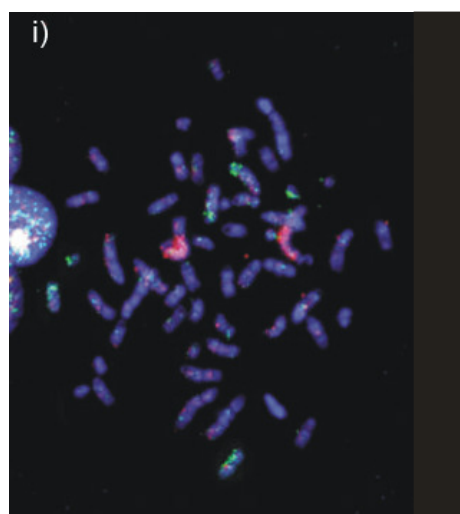
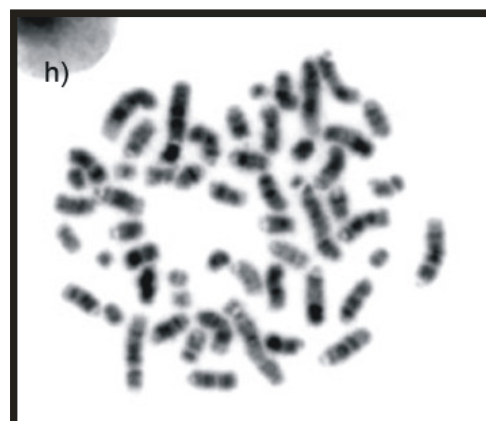
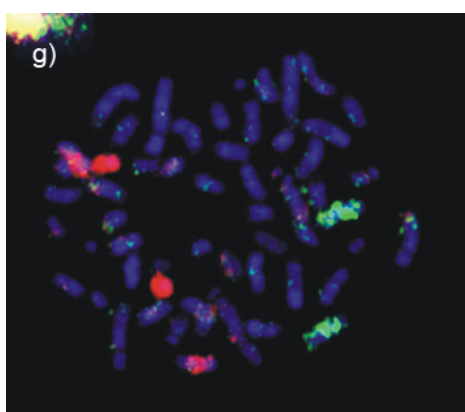
Figura 18 – a) a v): Hibridações *in situ* com todas as 20 sondas cromossomo específicas de MMU em metáfases de *Oxymycterus* sp., $2n = 54$. a) marcações em vermelho do cromossomo 1 e em verde do cromossomo 2; b) metáfase (a) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; c) marcações em verde do cromossomo 4; d) metáfase (c) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; e) marcações em vermelho do cromossomo 3 e em verde do cromossomo 12; f) metáfase (e) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



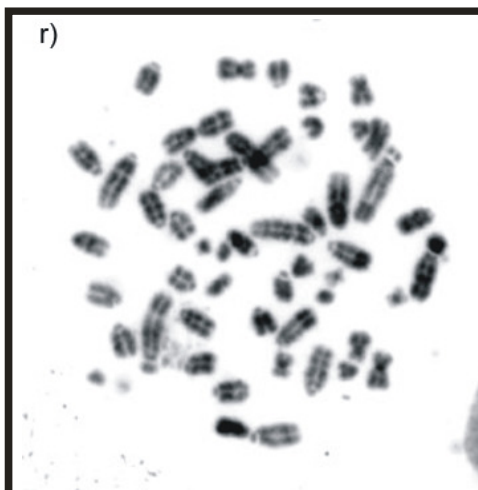
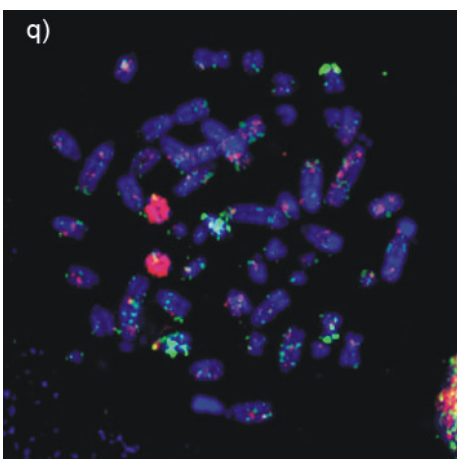
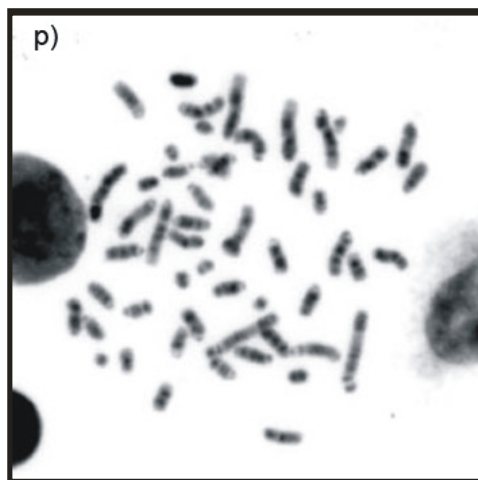
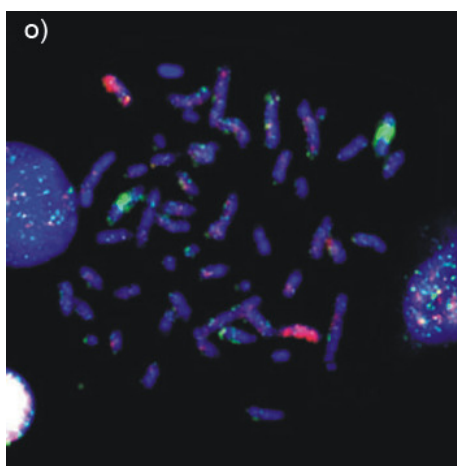
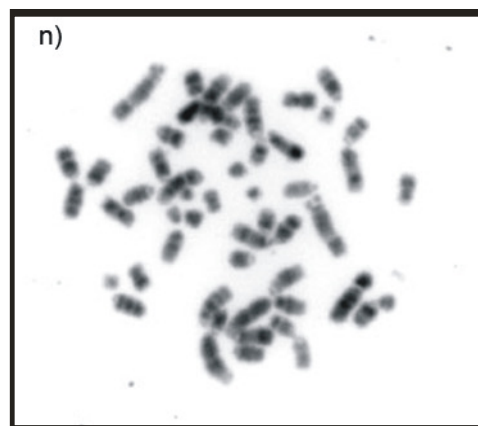
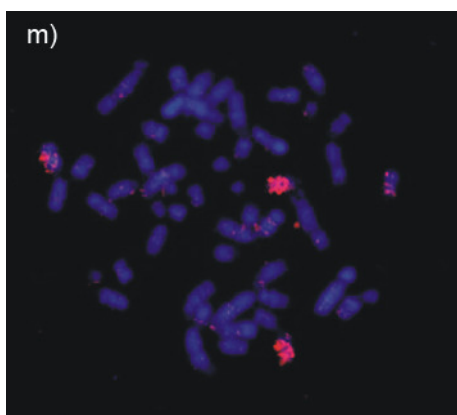
g) marcações em vermelho do cromossomo 5 e em verde do cromossomo 6; h) metáfase (g) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; i) marcações em vermelho do cromossomo 7 e em verde do cromossomo 8; j) metáfase (i) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; k) marcações em vermelho do cromossomo 9 e em verde do cromossomo 10; l) metáfase (k) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



m) marcações em vermelho do cromossomo 11; n) metáfase (m) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; o) marcações em vermelho do cromossomo 13 e em verde do cromossomo 14; p) metáfase (o) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; q) marcações em vermelho do cromossomo 15 e em verde do cromossomo 16; r) metáfase (q) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI;

continua



s) marcações em vermelho do cromossomo 17 e em verde do cromossomo 18; t) metáfase (s) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI; u) marcações em vermelho do cromossomo 19 e verde do cromossomo X; v) metáfase (u) com contracoloração de Actinomicina D/DAPI

conclusão

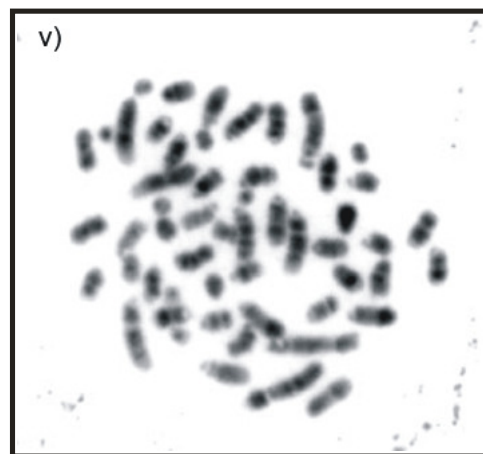
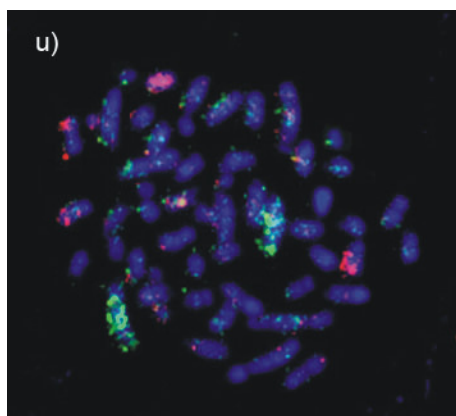
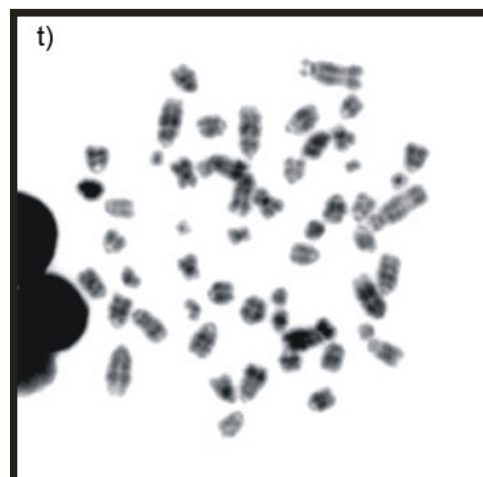
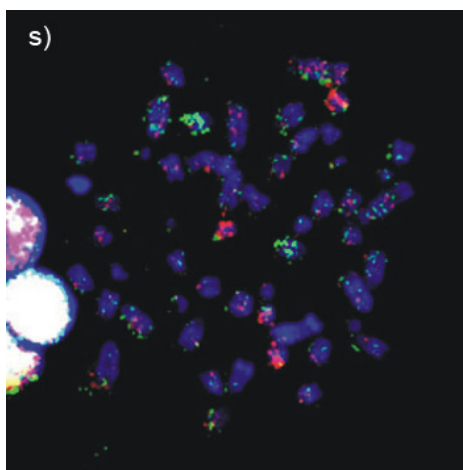
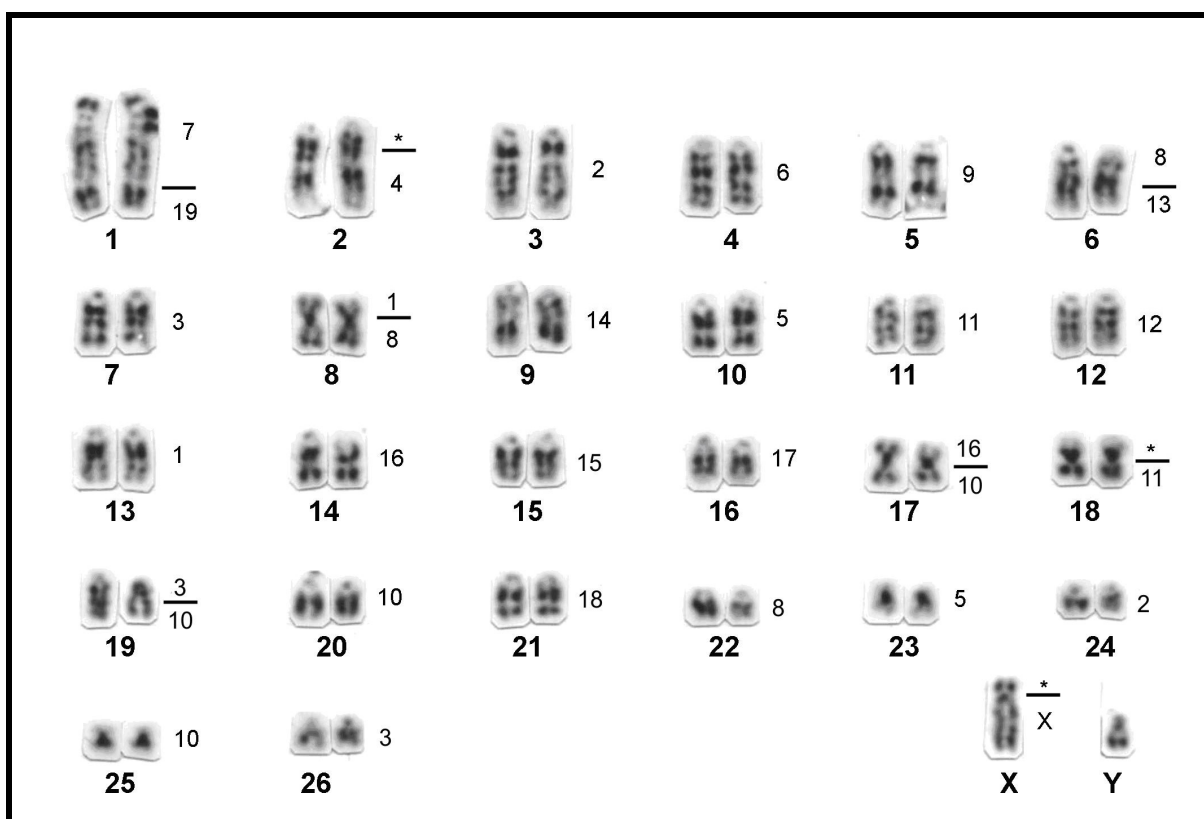


Figura 19 – Cariótipo em banda G de *Oxymycterus* sp. , $2n = 54$, onde os cromossomos de OSP estão numerados abaixo, conforme a nomenclatura proposta por SBALQUEIRO (1989). A hibridação com as sondas dos cromossomos de *Mus musculus* estão assinaladas na direita. O asterisco denota regiões não hibridadas



4. CARIÓTIPO ANCESTRAL DOS ROEDORES

Os resultados obtidos após os experimentos de hibridação nas espécies de akodontinos forneceram também subsídios para uma melhor compreensão da reconstrução do cariótipo ancestral dos roedores proposta por FROENICKE (2005).

4. 1. Comparações entre os dados de akodontinos e o mapa cromossômico de MMU identificados com os respectivos cromossomos de *Homo sapiens* (HSA)

Esta análise procurou demonstrar as possíveis evidências de que as associações sintênicas mais observadas entre os akodontinos: 7/19, 6/12, 8/13 e 3/18, sejam representativas e consistentes com os modelos de cariótipos ancestrais dos roedores encontrados na literatura.

Portanto, a partir da utilização do idiograma de MMU (*Mus musculus*), com as homeologias de HSA (*Homo sapiens*), pode-se verificar que: a associação 7/19 apresentou correspondência entre os segmentos dos cromossomos 10 e 11 de HSA em ambos os cromossomos de MMU (7 e 19). A associação 6/12 mostrou ser um dado consistente, pois verificados os segmentos dos cromossomos 2 e 7 de HSA nos cromossomos 6 e 12 de MMU. A associação MMU -8/13 também demonstrou correspondência, pois os segmentos cromossômicos 4 e 8 de HSA encontram-se homeologicamente nos cromossomos 8 e 13 de MMU. Já a sintonia 3/18, evidenciou MMU 3 é parcialmente homeólogo à parte do HSA 3, o mesmo ocorrendo com o MMU 18 que apresentou homeologia parcial com HSA 18 (Figura 20). Nesta figura este representado o idiograma haplóide de MMU, seguindo o modelo proposto na Figura 2 (item 5.1. em Materiais e Métodos – p. 55).

Outras associações foram verificadas em menor frequência como: MMU 5/7 em *A. cursor* e *N. lasiurus*; MMU 8/17 em *A. montensis* e *N. lasiurus* e MMU 10/16 em *N. lasiurus* e *Oxymycterus* sp.

4. 2. Contribuição ao modelo cariotípico do Roedor Ancestral

As associações MMU (-7/19, -6/12, -8/13 e -3/18) observadas nas espécies estudadas no presente trabalho, em comparação com os dados da literatura, contribuíram para uma melhor compreensão do modelo do cariótipo ancestral para os roedores, proposto por FROENICKE (2005).

A associação MMU 8/13 corrobora com uma associação HSA 8/4/8 evidenciada no modelo cariotípico da literatura (Figura 21). Esta associação seria resultante da associação MMU 8/13 detectada, entre outros akodontinos, no cromossomo 5 de ACU (Figura 5) correspondente aos cromossomos MMU 8 e 13 da Figura 20. Tanto no cromossomo MMU 8 como no MMU 13 há uma associação HSA 4/8 (Figura 20, caixa amarela). Já a associação MMU 3/18, vem a reforçar a característica de sintenia do cromossomo MMU 18 que no modelo ancestral também é sintênico. Por outro lado, a associação MMU 7/19 detectada nos akodontinos e de acordo com a Figura 20, onde se observam os cromossomos HSA 10 e 11 em associação (caixas em vermelho), sugere uma fusão cêntrica entre os segmentos cromossômicos 10q e 11 do modelo cariotípico ancestral (Figura 21).

Figura 20 – Idiograma haplóide de MMU com as homeologias dos cromossomos de HSA numerados à direita. Abaixo o número dos cromossomos de MMU e seus respectivos pesos moleculares. Indicações em verde representam a associação 3/18, em azul a 6/12, em amarelo a 8/13 e em vermelho a 7/19. As caixas coloridas representam as homeologias das associações dos akodontinos e suas correspondências nos cromossomos humanos

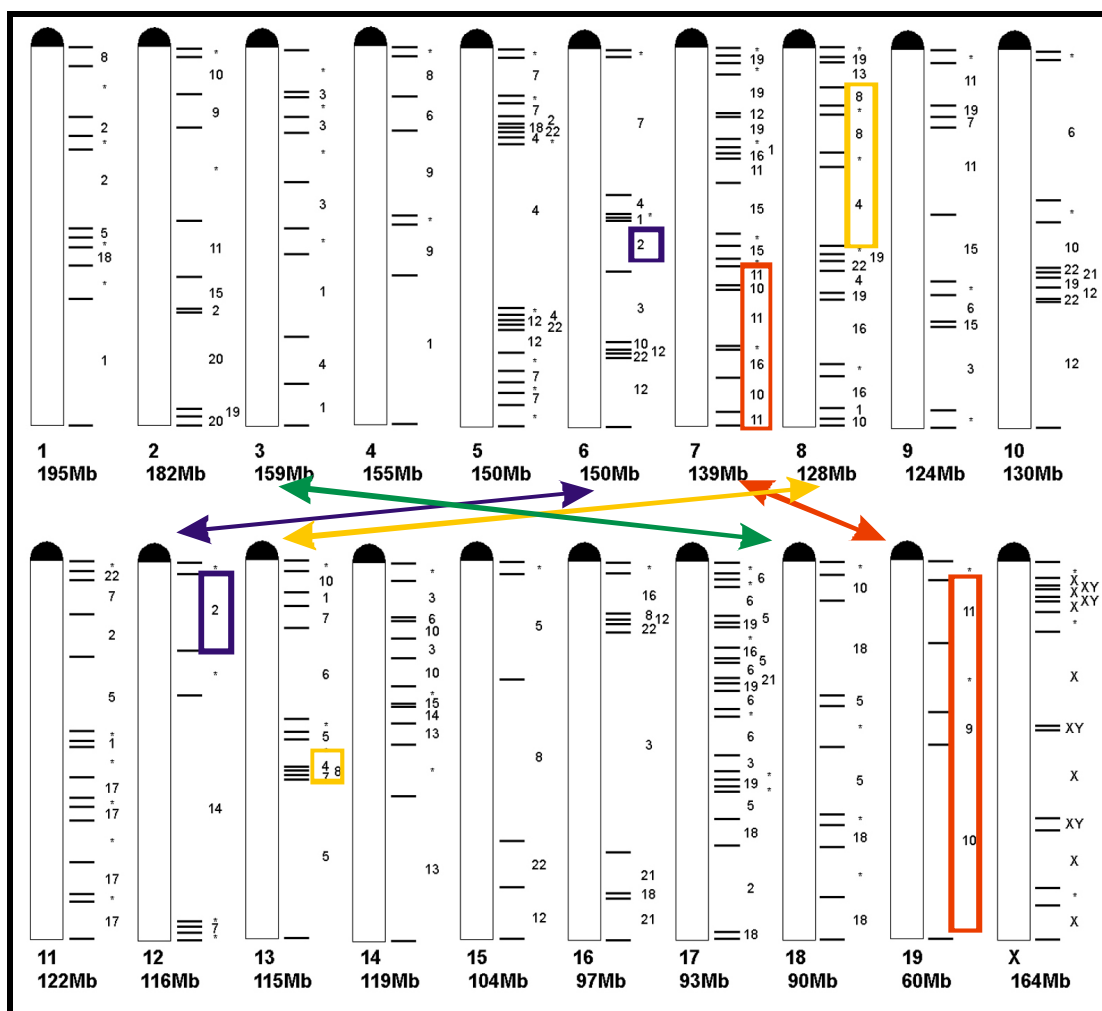
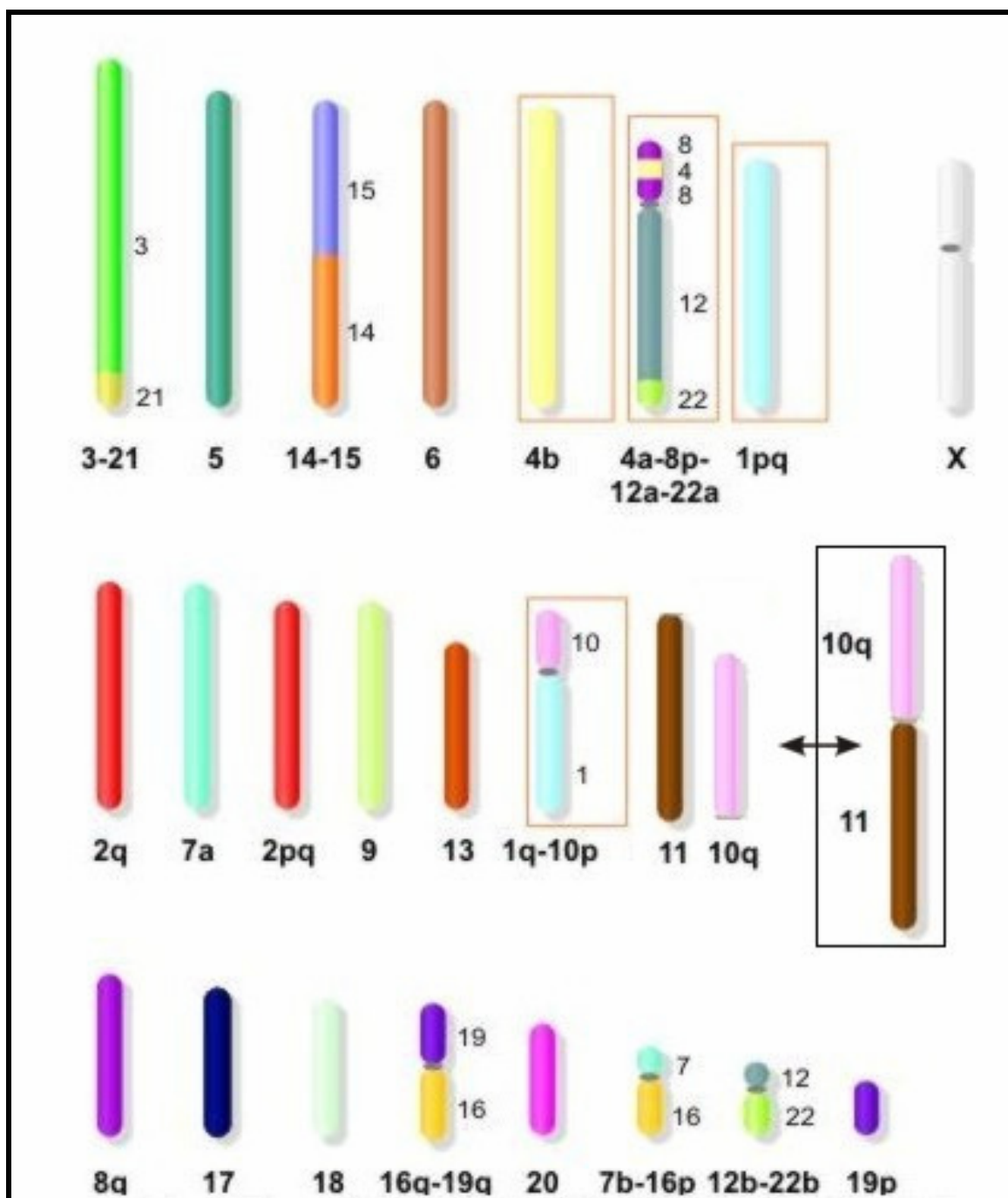


Figura 21 – Idiograma do provável novo modelo de cariótipo do roedor ancestral segundo FROENICKE et al. (2006). A caixa em moldura preta, sugere o rearranjo fusão cêntrica (flecha) entre os segmentos 10q e 11, a partir da identificação da sintenia 7/19 observada entre os akodontinos e representantes roedores do Velho Mundo. Os números abaixo das representações cromossômicas indicam os correspondentes cromossomos humanos



5. Relações Filogenéticas entre os Akodontinos

Nesta análise foram incluídos oito táxons de Akodontinos ACU, AMO, APA, ASE, TNI, NLA, BGR e OSP. Como grupo externo foram utilizados os dados de MMU e de CGR (*Cricetulus griseus*).

A matriz de dados dos akodontinos foi composta por 110 caracteres, sendo 20 atribuídos às hibridações das sondas de MMU de 1 a 19, mais o cromossomo sexual X. Os demais caracteres foram referentes a mudanças de estado dos primeiros 20, ou seja, presença de mais de um sinal para cada sonda cromossômica de MMU ou associações verificadas nas espécies de akodontinos. As associações sintênicas como: 3/18, 6/12, 7/19 e 8/13 foram compartilhadas entre os akodontinos, no entanto, a sintenia 7/19 também foi detectada na espécie CGR.

5. 1. Utilização de MMU como grupo externo

A análise no programa PAUP foi realizada através de comandos de pesquisa Heurística, parsimônia e com aceleração da transformação do caráter. Também se consideraram os caracteres desordenadamente e com pesos iguais para cada um. A árvore obtida não foi enraizada, apesar da utilização de MMU como grupo externo. Dos 110 caracteres 14 foram considerados constantes, 58 viáveis e não informativos na parcimônia e 38 informativos para a obtenção da parcimônia.

A árvore mais parcimoniosa (Figura 22) revelou a presença de um grupo constituído por sete das oito espécies de akodontinos, exceto OSP, onde se observa o agrupamento de três espécies do gênero *Akodon* (ACU, AMO e APA), evidenciado por um Bootstrap igual a 52%. Próximo a este se uni ASE, formando um clado mais amplo neste gênero, e sucessivamente vão se agrupando as demais espécies (NLA, TNI e BGR).

5. 2. Utilização de CGR como grupo externo

Para esta análise foram utilizados os mesmos parâmetros do item 5.1., porém o grupo externo considerado foi CGR. Também se levaram em conta os caracteres desordenadamente e com pesos iguais para cada um. Dos 110 caracteres seis (6) foram considerados constantes, 64 viáveis e não informativos na parcimônia e 40 informativos para a obtenção da parcimônia.

A árvore mais parcimoniosa obtida (Figura 23) mostrou a formação de dois grupos bem distintos, porém não ligados entre si. No primeiro grupo observa-se a formação de um subgrupo (ACU, AMO e APA) similar ao verificado na Figura 20. A este agrupamento, como observado na figura anterior, une-se ASE e NLA. O Bootstrap de 87% mostra uma boa consistência a este agrupamento. O outro agrupamento uniu as três espécies (TNI, BGR e OSP), com um Bootstrap de 53%.

Figura 22 – Árvore filogenética obtida a partir da análise dos dados obtidos pela técnica de ZOO-FISH com sondas de MMU em espécies de akodontinos. NP = número de passos da árvore; IC = índice de consistência; IR = índice de retenção. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores do Bootstrap em porcentagem

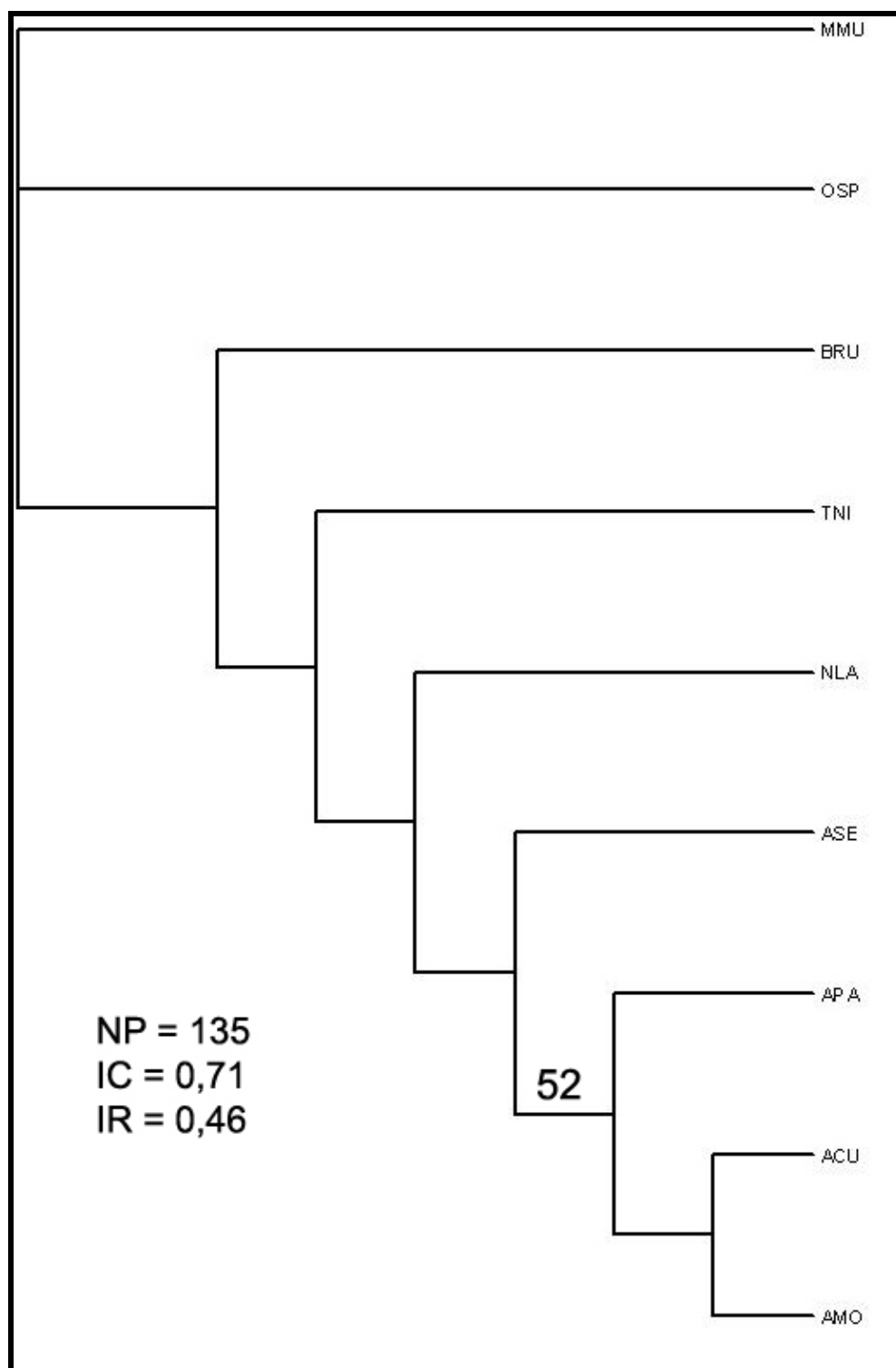
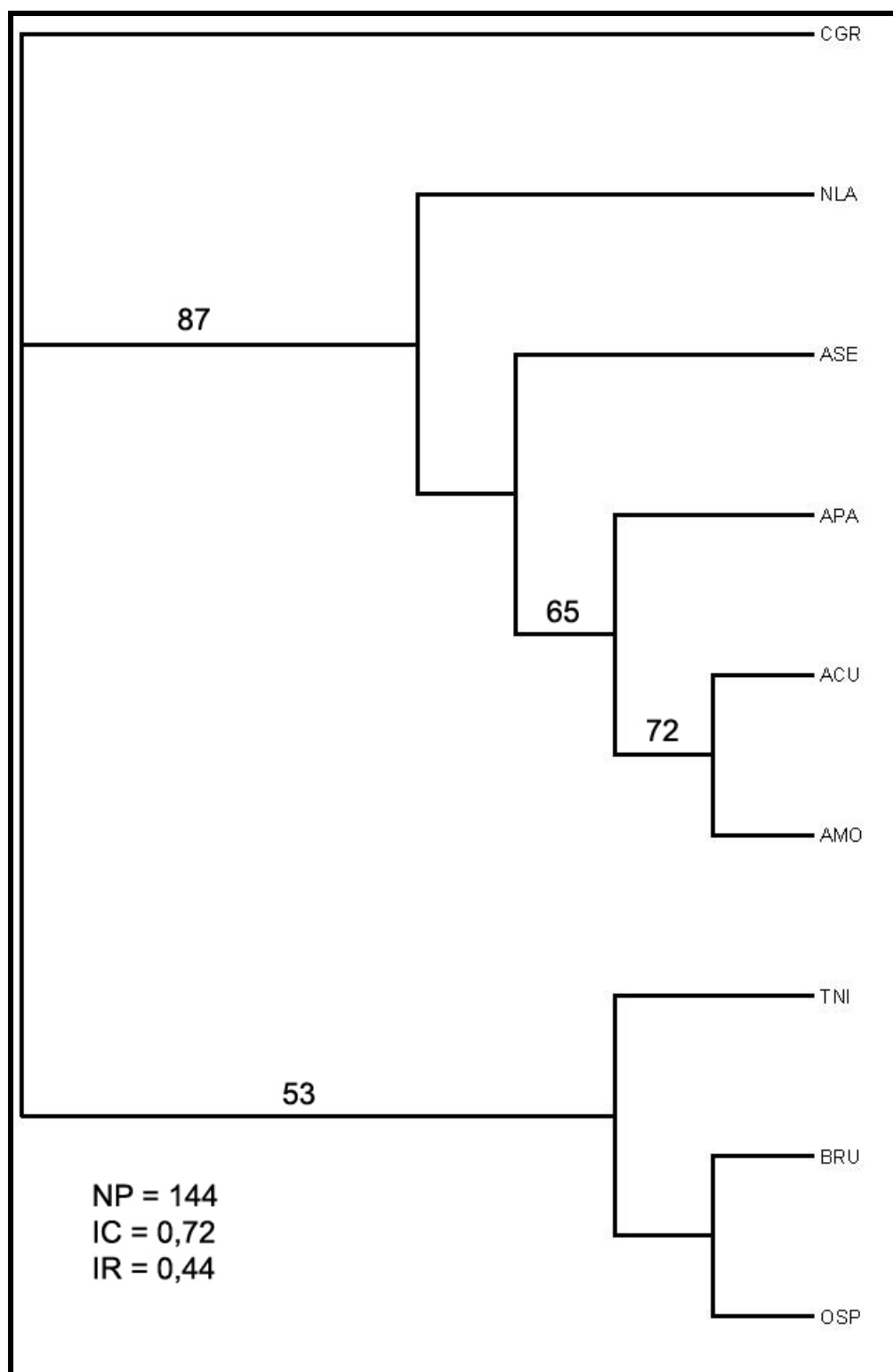


Figura 23 – Árvore filogenética obtida a partir da análise dos dados obtidos pela técnica de ZOO-FISH com sondas de MMU em espécies de akodontinos. NP = número de passos da árvore; IC = índice de consistência; IR = índice de retenção. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores do Bootstrap em porcentagem



6. Relações Filogenéticas entre os akodontinos e roedores do Velho Mundo

Nesta análise envolvendo 15 táxons, oito táxons são akodontinos, mais o MMU, o CGR e cinco táxons de roedores do Velho Mundo. Estes táxons também tiveram seus cromossomos hibridados com sondas cromossomo-específicas de MMU: MPL (*Mus platythix*), ASY (*Apodemus sylvaticus*), RNO (*Rattus norvegicus*), RPU (*Rhebdomys pumilio*) e *Otomys irroratus* (OIR).

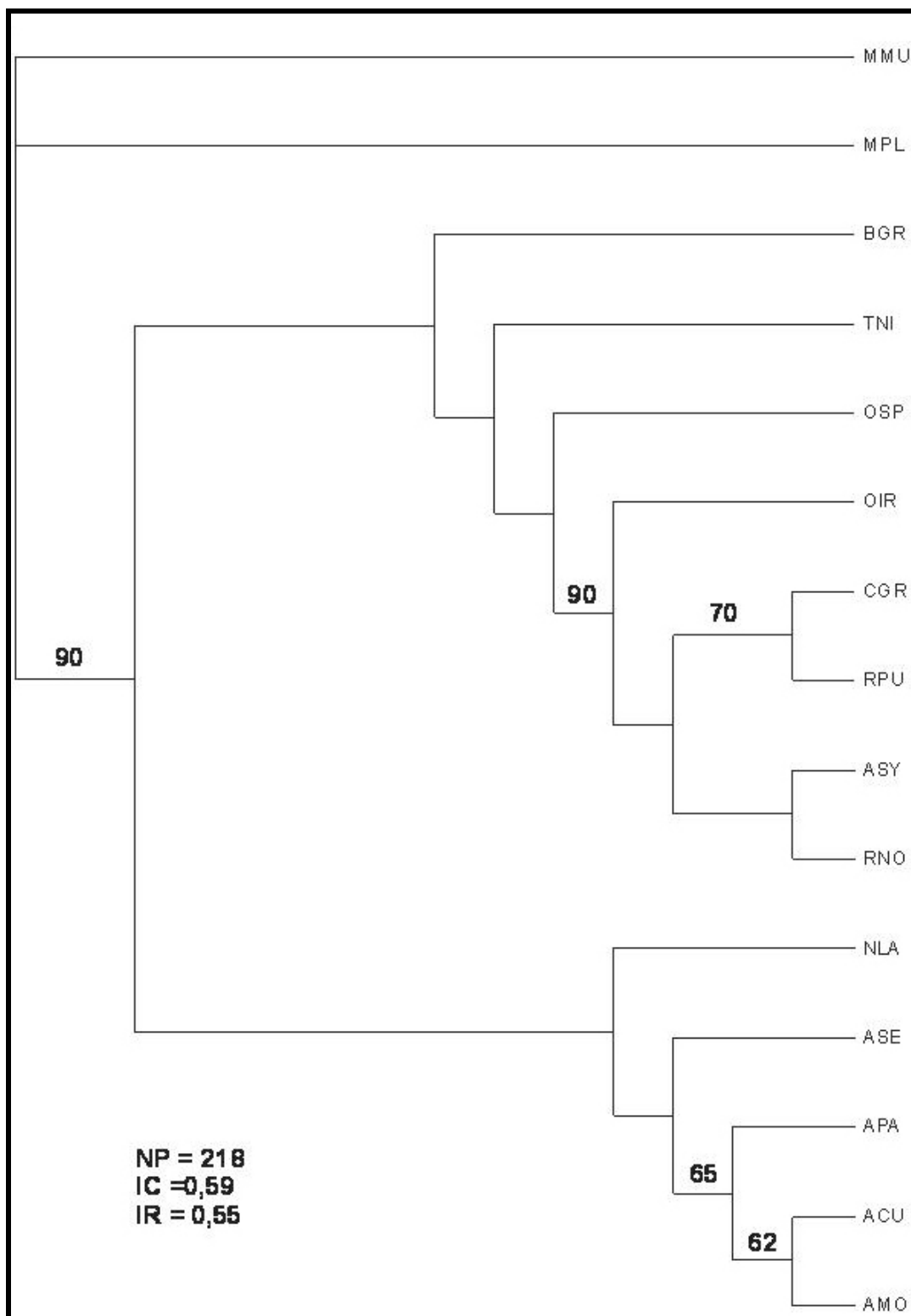
A matriz foi composta de 137 caracteres, sendo 20 atribuídos às hibridações das sondas de MMU de 1 a 19, mais o cromossomo sexual X. Os demais caracteres foram referentes a mudanças de estado dos primeiros 20, ou seja, presença de mais de um sinal para cada sonda cromossômica de MMU ou associações verificadas nas espécies de akodontinos e da literatura.

6. 1. Utilização de MMU como grupo externo

A análise no programa PAUP foi realizada através de comandos de pesquisa Heurística, parsimônia e com aceleração da transformação do caráter. Também se consideraram os caracteres desordenadamente e com pesos iguais para cada um. A árvore obtida não foi enraizada, e utilizou MMU como grupo externo. Dos 137 caracteres nove (9) foram considerados constantes, 62 viáveis e não informativos na parcimônia e 66 informativos para a obtenção da parsimônia.

A árvore mais parcimoniosa (Figura 24) mostra a formação de uma politomia com os táxons MMU e MPL e um grupamento evidenciando dois ramos bem distintos, porém unidos com um Bootstrap de 90%. Um dos grupos é formado pelas espécies do gênero *Akodon* (ACU, AMO, APA e ASE) mais *Necromys lasiurus*, sobressaindo-se novamente a formação do grupamento (ACU, AMO e APA, Bootstrap = 65%), como identificado nas árvores anteriores. O outro agrupo na maioria das espécies descritas na literatura (CGR, RPU, ASY, RNO, OIR) mais os demais akodontinos (OSP, TNI e BGR). Destaca-se também neste agrupamento um subgrupo formado exclusivamente pelas espécies do Velho Mundo (Bootstrap = 90%).

Figura 24 – Árvore filogenética obtida a partir da análise dos dados obtidos pela técnica de ZOO – FISH com sondas de MMU em espécies de akodontinos e nos dados de literatura. NP = número de passos da árvore; IC = índice de consistência; IR = índice de retenção. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores do Bootstrap em porcentagem

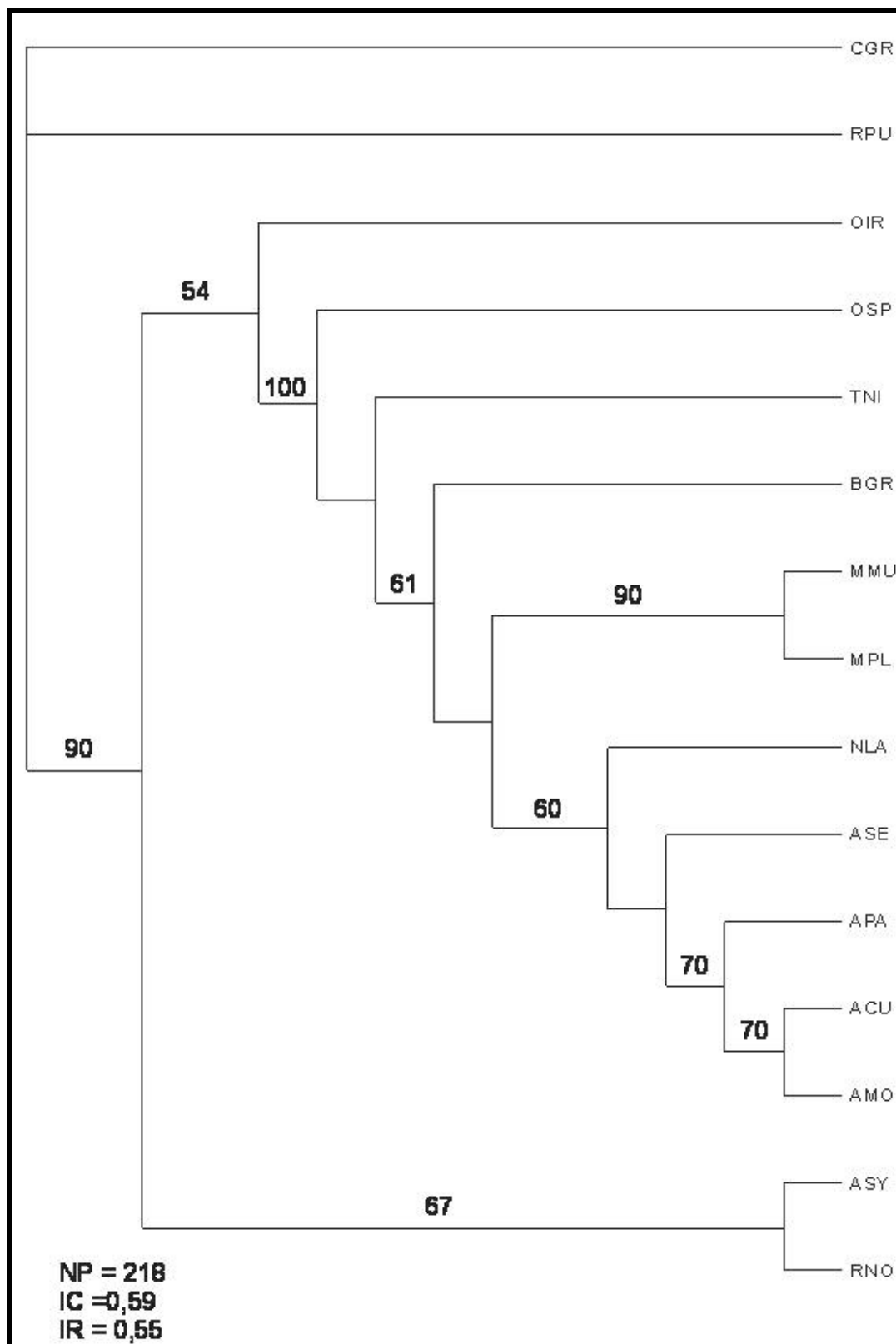


6. 2. Utilização de CGR como grupo externo

Para esta análise foram utilizados os mesmos parâmetros do item 6.1., porém o grupo externo considerado foi CGR. Dos 137 caracteres nove (9) foram considerados constantes, 62 caracteres viáveis foram não informativos na parcimônia e 66 caracteres foram informativos para a obtenção da parsimônia.

A árvore mais parcimoniosa (Figura 25) mostra um politomia (CGR e RPU) e um grupamento maior dividido em dois ramos. Um deles (Bootstrap = 67%) uniu ASY a RNO. O outro reúne todos os akodontinos a táxons do Velho Mundo (MMU, MPL e OIR). Novamente, à semelhança das árvores anteriores, a formação de um ramo entre as espécies do gênero *Akodon* e *Necromys lasiurus*.

Figura 25 – Árvore filogenética obtida a partir da análise dos dados obtidos pela técnica de ZOO – FISH com sondas de MMU em espécies de akodontinos e nos dados de literatura. NP = número de passos da árvore; IC = índice de consistência; IR = índice de retenção. Os números indicados nos ramos correspondem aos valores do Bootstrap em porcentagem



IV. DISCUSSÃO

1. UTILIZAÇÃO DE ZOO-FISH PARA A DETECÇÃO DE HOMEOLOGIAS CROMOSSÔMICAS EM ROEDORES

A partir da década de 90, os estudos comparativos envolvendo cariótipos e as técnicas de hibridação cromossômica, principalmente ZOO-FISH, tiveram um grande avanço, e são consideradas de grande importância à compreensão dos mecanismos ou rearranjos cromossômicos que deram origem aos mais diversos conjuntos cromossômicos observados nas espécies. Desde então, estas técnicas têm sido amplamente empregadas para a detecção de homeologias entre as mais variadas espécies de animais. Sondas cromossomo-específicas de humanos têm sido empregadas em estudos envolvendo primatas, carnívoros, cervídeos, marsupiais, felinos e aves, detectando uma alta similaridade dentro e/ou entre estes grupos (HAMEISTER et al., 1997; STANYON et al., 1999; CARVALHO; MATTEVI, 2000; BONNET-GARNIER et al., 2003; DE OLIVEIRA et al., 2002 e 2005a, b).

No que diz respeito ao emprego das técnicas de hibridação cromossômica em roedores (ZOO-FISH), nota-se que a maioria dos trabalhos se concentram em espécies Europeias e Asiáticas (YANG; O'BRIEN; FERGUSON-SMITH, 2000; CAVAGNA; STNO; STANYON, 2002; MATSUBARA et al., 2003 e 2004; RAMBAU; ROBISSON, 2003; STANYON et al., 2004; ENGELBRECHT; DOBIGNY; ROBINSON, 2006). Nas espécies de sul-americanos têm-se verificado um número mais reduzido de trabalhos, destacando-se os estudos que levam em consideração a localização de regiões teloméricas (FAGUNDES, et al., 1997a; FAGUNDES; YONENAGA-YASSUDA, 1998; SILVA; YONENAGA-YASSUDA, 1998; ANDRADES-MIRANDA et al., 1999; VIEIRA et al., 2004). Porém, há um trabalho envolvendo hibridação com sonda cromossomo-específica na determinação de homeologias cromossômicas entre espécies da Tribo Akodontini (FAGUNDES et al., 1997b).

O presente trabalho visa contribuir à problemática citotaxonômica e evolutiva ocorrentes nos roedores neotropicais através da aplicação da técnica de hibridação *in situ*.

Nossos dados mostram entre 25 a 32 homeologias em relação a *Mus musculus*, que é inferior ao verificado entre várias espécies de roedores do Velho

Mundo (26 a 47) e MMU. Isto pode ser reflexo de um maior grau de parentesco entre a espécie *Mus musculus* (MMU), que originou as sondas cromossomo-específicas, e as sul-americanas, aqui estudadas; ou esta refletindo a ocorrência de processos evolutivos das espécies neotropicais que ocorreram a partir de um ancestral comum a *Mus musculus*.

A partir da utilização destas sondas cromossômicas ocorreu a identificação de muitas associações que envolvem as espécies de roedores sul-americanas. Porém, nem todas as sondas de MMU apresentaram sinais de hibridação em todos os cromossomos das espécies da nossa amostra, sendo que não foi identificado o sinal da sonda MMU-10 em ASE e de MMU-18 em BGR (devido provavelmente estas sondas estarem divididas em muitos pedaços pequenos e espalhados pelos cromossomos de ASE e BGR). Uma possível explicação para falta de sinal no cromossomo 19 de BGR dever-se-ia à não hibridação de MMU-18 em BGR, uma vez que esta sonda apresenta um caráter sintênico em todas as demais espécies estudadas. Já a não observação da hibridação com a sonda MMU-10 em ASE pode ser explicada por esta sonda ter sido detectada normalmente, entre as espécies hibridadas, em vários fragmentos o que pode ter dificultado a sua sinalização em ASE.

Nossos experimentos apresentaram uma certa quantidade de marcações de fundo ou inespecíficas, que podem estar relacionadas com a distância evolutiva entre a espécie MMU, doadora das sondas, e as espécies aqui analisadas, já que se admite que o processo evolutivo em roedores ocorre 10 vezes mais rápido que nas demais espécies de mamíferos (STANYON et al., 2003). Porém estas marcações inespecíficas não tiveram influência negativa nos nossos resultados, sendo estes muito importantes ao fornecer mais subsídios ao esclarecimento do posicionamento taxonômico do grupo akodontino em relação às demais espécies de roedores neotropicais. Estes dados servem, pois, de ponto de partida para futuros experimentos com pintura cromossômica nestes animais devido à necessidade de um maior número de estudos neste grupo complexo, visando um melhor entendimento dos caminhos evolutivos galgados por eles desde suas chegadas ao Continente Sul-Americano.

2. ESTUDOS FILOGENÉTICOS EM ROEDORES DA TRIBO AKODONTINI ATRAVÉS DA ANÁLISE CROMOSSÔMICA COM EMPREGO DE BANDEAMENTO G E FISH

Até o momento, a maior contribuição para o entendimento filogenético e evolutivo dos roedores neotropicais, através da análise detalhada dos cromossomos, deu-se por intermédio de estudos comparativos em bandas C, G e NOR (BAKER; KOOP; HAIDUK, 1983; SBALQUEIRO, 1989; ESPINOSA; REIG, 1991; GEISE; CANAVEZ; SEUÁNEZ, 1998; MARTINO; FILIPPUCCI; CAPANNA, 2002). Estes trabalhos evidenciaram que, apesar de contribuírem para a sistemática do grupo, em certos casos as presenças de rearranjos complexos não foram suficientemente esclarecidos pelos padrões de bandeamentos apresentados (GEISE; CANAVEZ; SEUÁNEZ, 1998). Assim, as técnicas de hibridação *in situ*, principalmente as que utilizam sondas cromossomo-específicas, vêm contribuir de uma forma mais efetiva, servindo como mais uma estratégia a ser empregada nos estudos evolutivos que envolvem a análise de homeologias cromossômicas.

Algumas das espécies de akodontinos estudadas no presente trabalho já foram alvos de análises filogenéticas com técnicas clássicas de bandeamento. Por outro lado, apresentamos um estudo filogenético, fundamentado em dados da citogenética molecular, envolvendo oito espécies pertencentes à Tribo Akodontini, onde procuramos demonstrar que apesar da variabilidade cariotípica existente neste grupo, evidencia-se uma unidade diferente daquelas observadas na região Central e Norte do Continente Americano, bem como daquelas dos Continentes Europeu, Asiático e Africano.

Já ao compararmos as homeologias por nós evidenciadas com as descritas na literatura (SBALQUEIRO, 1989; GEISE; CANAVEZ; SEUÁNEZ, 1998), nota-se que os dados obtidos a partir do bandeamento G, apesar de terem contribuído muito e serem considerados como ponto de partida para os estudos filogenéticos, apresentam limitações, pois as similaridades sugeridas por estes autores não estão em concordância com muitos dos nossos achados. Por outro lado, quando foram comparados os segmentos cromossômicos entre as espécies de ACU, com $2n = 14$ e 16 , e AMO $2n = 24$, os resultados observados por FAGUNDES; YONENAGA-YASSUDA (1998) mostram uma similaridade acentuada com os aqui verificados.

SBALQUEIRO (1989) realizou um estudo filogenético cromossômico, envolvendo *Akodon azarae* (AAZ), *A. montensis* (AMO), *A. paranaensis* (APA), *A. serrensis* (ASE), *Necomys lasiurus* (NLA), *Deltamys kempi* (DKE) e *Oxymycterus* sp. (OSP). Os resultados apontam uma coesão entre as espécies relacionadas com o gênero *Akodon* em relação às espécies *Oligoryzomys flavescens* (OFL) e *Oxymycterus* sp., a primeira utilizada como grupo externo. Este autor mostrou um panorama parecido ao observado neste trabalho, ou seja, *Oxymycterus* sp. colocando-se em separado dos demais akodontinos. Um outro ponto interessante a ser discutido diz respeito à hipótese lançada por SBALQUEIRO (1989), de que o cromossomo APA-6 (= ASE-6) estaria envolvido em um processo de fusão com dois cromossomos 13 e 21 de ASE (=APA-13 e -21). Porém, este rearranjo não foi verificado em nossos dados, já que APA-6 é igual a MMU-4 e ASE-13 e -21 são iguais a MMU-6 e -5, mas, como discutido pelo autor, houve dificuldades para confirmar as homeologias em banda G entre estes cromossomos.

Já no trabalho de GEISE; CANAVEZ; SEUÁNEZ (1998), os autores apresentaram uma proposta filogenética, também com dados de banda G, para as espécies de *A. cursor* (ACU), *A. aff. cursor* (= *A. cursor*), *A. montensis* (AMO), *A. lindberghi* (ALI), *A. serrensis* e *Necomys lasiurus*. Como estes autores não utilizaram grupo externo, o resultado da parcimônia apresentou grande afinidade entre as espécies de ACU e AMO, e a espécie NLA também ficou posicionada mais externamente às espécies do gênero *Akodon*, como observada na parcimônia obtida neste estudo.

A grande divergência, devido à baixa concordância dos dados de GEISE; CANAVEZ; SEUÁNEZ (1998) em relação aos nossos, ocorre quando da comparação dos segmentos cromossômicos das outras três espécies *A. lindberghi*, *A. serrensis* e *Necomys lasiurus*, na reconstrução cariotípica de ACU. As homeologias propostas por estes autores representam quase que somente a metade das homeologias por nós detectadas, revelando uma baixa resolução do método para a análise dos possíveis rearranjos cromossômicos envolvidos na complexa homeologia cromossômica destas espécies.

Estas constatações mostram que o bandeamento G apresenta-se consistente quando a comparação de segmentos e ou braços cromossômicos é realizada entre espécies que apresentam um número diplóide similar ou quando os cariótipos

analisados são de espécies afins. A alta homeologia entre ACU e AMO pode ser explicada através do que foi demonstrado por YONENAGA et al. (1975), que estas espécies são capazes de produzir híbridos interespecíficos, no entanto inférteis. Estes autores verificaram que os complementos haplóides das duas espécies, que compuseram este híbrido, apresentaram-se correspondentes, sugerindo que os cromossomos ou segmentos cromossômicos são exatamente os mesmos, pois mostraram pareamento homeólogo nas células híbridas.

Os dados do presente trabalho também não evidenciaram as homeologias entre os braços cromossômicos de AMO e NLA conforme sugestão de FAGUNDES; YONENAGA-YASSUDA (1998), após emprego de banda G e hibridação com sondas teloméricas. Igualmente há discordância em que os rearranjos cromossômicos envolvidos na formação do cromossomo AMO-3 seriam bem mais complexos que o descrito, por estes autores, que atribuíram a existência de um sinal telomérico correspondente à fusão cêntrica dos cromossomos 6 e 7 de NLA e ao compararem esta fusão ao cariótipo de AMO, sugerem ser uma homeologia com o cromossomo AMO-3. Nossos resultados demonstraram que AMO-3 seria equivalente a quatro cromossomos de NLA (NLA-1, -8, -9 e -15) que teriam experimentado vários processos de fissão cromossômica, fusão em tandem, translocações e fusão cêntrica, sendo estas homeologias não evidenciadas por bandeamento G. Nossos dados confirmam, assim, as observações de que nem sempre esta técnica é capaz de identificar satisfatoriamente homeologias envolvidas em rearranjos complexos.

Também, em relação aos demais cromossomos encontramos pouca similaridade após aplicação da ZOO-FISH, com sondas de MMU, o que contrasta com os dados das comparações em bandeamento G realizadas por FAGUNDES; YONENAGA-YASSUDA (1998). Muitas comparações apresentaram-se não procedentes, como é o caso da comparação dos cromossomos NLA-6 e -7 com o AMO-3; cromossomo NLA-14 e AMO-7; cromossomo AMO-9 com o NLA-9 e o cromossomo NLA-15 com AMO-10. Outras comparações de segmentos cromossômicos verificaram certa similaridade entre os dados da literatura e os que foram obtidos por nós, como é o caso da homeologia parcial entre os cromossomos NLA-5 e -10 com AMO-1; cromossomo NLA-3 com parte do cromossomo AMO-2; cromossomo NLA-12 com o braço longo de AMO-4; homeologia parcial de NLA-1 com AMO-5 e homeologia de NLA-13 com o AMO-8q. Estes dados não totalmente

concordantes sugerem que as comparações cromossômicas com banda G podem solucionar parte da problemática, mas que muitos padrões de banda similares podem ser pertencentes a regiões cromossômicas não homeólogas e que são mais bem evidenciadas por técnicas de hibridação *in situ*.

Nosso trabalho evidenciou uma quase total concordância com os experimentos de FAGUNDES, et al. (1997b), e ressalte-se que utilizamos sondas cromossômicas de uma espécie da Subfamília Muridae do Velho Mundo, portanto, podemos considerar que os dados aqui observados são bem consistentes, como demonstrado na similaridade entre os cromossomos ACU-1b (Figura 4) e os cromossomos AMO-7, -8 e 9q (Figura 6). Estes autores analisaram as relações cromossômicas entre ACU e AMO, após microdissecção do segmento cromossômico ACU-1b (ZOO-FISH) e posterior hibridação em metáfases de AMO. A sonda cromossomo-específica 1b produziu sinais de hibridação nos pares cromossômicos AMO-7, -8 e -9q. Estas similaridades nos resultados demonstram o alto poder das técnicas de hibridação *in situ* através do emprego da técnica de FISH com sondas cromossomo-específicas.

SILVA; YONENAGA-YASSUDA (1998), ao compararem os cariótipos de ACU e uma nova espécie de *Akodon* (ainda não identificada taxonomicamente), com $2n = 10$, verificaram uma alta similaridade cariotípica entre as duas. Observaram que a ocorrência de polimorfismos cromossômicos, devido a inversões pericêntricas mais um rearranjo no cromossomo ACU-1, poderiam explicar os achados intersticiais nas regiões pericentroméricas do par 1, e das regiões 1p e 3q de *Akodon* sp. , que mostraram sinais de hibridação com sondas teloméricas. Estes autores propõem que estas regiões teloméricas intersticiais seriam remanescentes de eventos de fusões cromossômicas recentes e que teriam ocorrido no surgimento da nova espécie.

Achados similares, de segmentos teloméricos em regiões intersticiais dos cromossomos, também foram reportados por LEE; SASI; LIN (1993) ao evidenciarem a ocorrência de eventos de fusão em tandem na espécie de cervídeo indiano (*Muntiacus muntjac vaginalis*, $2n = 6/7$), postuladas como importantes na evolução cariotípica de cervídeos da Ásia. Mais recentemente, YANG et al., (1997) testaram a hipótese de que fusões em tandem seriam as responsáveis pela drástica redução cariotípica nessa espécie através de hibridações recíprocas com sondas cromossômicas de três espécies: *Muntiacus muntjac vaginalis*, *M. reevesi* e *Mazama gouazoubira*. Verificaram que as sintonias dos cromossomos 1, 2, 3, 4 e 5 do

cervídeo indiano, eram resultantes de rearranjos cromossômicos diferentes de fusões em tandem como sugerido por LEE; SASI; LIN (1993).

Desta forma, nossos dados alertam sobre a não ocorrência exclusiva ou em maior número de eventos de fusões em tandem, na diferenciação e evolução cariotípica dos roedores neotropicais como preconizado por muitos autores. Por conseguinte, os dados do presente trabalho não corroboram a proposição de FAGUNDES; YONENAGA-YASSUDA (1998), de que os sinais teloméricos intersticiais seriam resultantes da fusão entre os cromossomos NLA-6 e -7 formando o par AMO-3. O mesmo podemos afirmar em relação à proposta de SILVA; YONENAGA-YASSUDA (1998), comentada acima.

Evidencia-se novamente a importância da realização de experimentos com técnicas de FISH, em particular com sondas cromossomo-específicas, que garantem uma melhor compreensão e visualização dos rearranjos cromossômicos que estão envolvidos, de um modo em geral, na evolução cariotípica das espécies.

3. IMPORTÂNCIA DAS ASSOCIAÇÕES SINTÊNICAS NA ANCESTRALIDADE CARIOTÍPICA

Os dados do presente trabalho identificaram a associação MMU-7/19, igualmente verificada em outras seis espécies de roedores de Cricetidae e Muridae dos Continentes Europeu, Asiático e Africano, demonstrando, além da confiabilidade deste dado, a relação de afinidade taxonômica entre estes vários grupos.

Outras três associações, MMU-3/18, -6/12 e -8/13, também foram relevantes, pois mostram ser rearranjos exclusivos dos roedores Neotropicais do presente trabalho, em especial das espécies de *Akodon* mais a de *Necomys lasiurus*, e que podem estar envolvidos, de alguma forma, nos diferentes processos de evolução cariotípica experimentados por estes roedores ao alcançarem a América do Sul há aproximadamente 7 milhões de anos. Da mesma forma, estas associações também podem explicar ou confirmar a participação de poucos grupos no processo de colonização da América do Sul. Como *Necomys lasiurus* era normalmente incluída, até recentemente, no gênero *Akodon* e que a associação MMU-8/13 também foi

identificada em TNI e OSP, deduz-se que as associações MMU-3/18 e -6/12 são exclusivas das espécies de *Akodon*, podendo ser encontradas em espécies de gêneros afins, ainda não estudados por ZOO-FISH. Outro achado interessante foi à constatação do estado conservativo de cinco cromossomos entre os akodontinos (MMU-4, -9, -14, -18 e -19), correspondentes aos mesmos cinco descritos na literatura (YANG; O'BRIEN; FERGUSON-SMITH, 2000; STANYON et al., 2004; ENGELBRECHT; DOBIGNY; ROBINSON, 2006). Isto é sugestivo que estes segmentos cromossômicos contenham genes de alta importância à manutenção da vida destas espécies. No entanto, há necessidade de mais estudos comparativos, envolvendo genomas humanos ou de outros mamíferos ou mesmo de espécies de outras ordens de animais, na procura de explicações para esta manutenção e seu significado.

Dentre as associações verificadas nos roedores do Velho Mundo, duas foram evidenciadas em ACU (MMU-10/17 e -12/17), justamente a espécie considerada mais derivada dentre os akodontinos. Estas associações estão localizadas em uma região de inversão pericêntrica no cromossomo ACU-1b, no contexto de um rearranjo cromossômico complexo, e da região centromérica, representando, portanto um alto índice desta associação ter de novo surgido nesta espécie (neoapomorfia) e não ser uma simplesiomorfia herdada de seus ancestrais. Seria interessante confirmar esta proposição, através da identificação de pontos de quebra nesta posição. Outra sugestão seria a realização de experimentos com uma sonda região específica, que poderia ser hibridada em outras espécies, na procura do esclarecimento do que aconteceu neste ponto.

Merece atenção o trabalho de YANG; O'BRIEN; FERGUSON-SMITH (2000) que realizaram comparações cariotípicas com outra espécie de roedor, largamente utilizada em experimentos laboratoriais, o hamster chinês, *Cricetulus griseus*, $2n = 22$ (CGR). Os autores evidenciaram 47 homeologias com as 19 sondas cromossomo-específicas de MMU em CGR, as hibridações recíprocas identificaram 38 homeologias com as 10 sondas cromossomo-específicas de CGR em MMU. Os autores relacionaram as associações em comum entre RNO e CGR, e suas relações com os cromossomos de MMU-7/19, -13/15, -12/17, -17/1/17, -5/11, -2/13 e -11/17, sendo que estas podem representar associações ancestrais dos roedores. Em relação aos nossos dados, verificamos também a presença das sintenias 4, 9, 14,

18 e 19, e das associações sintênicas: 7/19 em toda nossa amostra e 12/17 em ACU, o que de certa forma reforça a hipótese de manutenção de certos grupos sintênicos durante os processos de diversificação dos roedores no geral.

Outra constatação, em relação ao nosso trabalho, deve-se a análise de um citótipo de *Rhabdomys pumilio* (RPU), $2n = 46$ (TAYLOR, 2000), uma abundante espécie de Muridae africano do Sahara. As hibridações com as 19 sondas cromossômicas de MMU mais a do cromossomo X nesta espécie, definiram 40 regiões de homeologia, dentre estas 10 identificaram um cromossomo ou região cromossômica em RPU (MMU-2-4, -7, -14-16, -18, -19 e -X), seis sondas identificaram dois sinais (MMU-5, -6, -8, -11, -12 e -13) e as demais sondas apresentaram três e mais sinais (MMU-9, -10 e -17). Com estas observações foi possível verificar a ocorrência das associações (7/19 e 10/17), sugeridas como específicas dos Muridae/Cricetidae, e que contribuíram significativamente ao modelo de cariótipo ancestral proposto por KOOP et al. (1984), baseado apenas em bandamento G. No entanto, a partir das nossas análises verificou-se que a associação sintênica MMU-7/19 é comum às oito espécies estudadas, reforçando ser esta um carácter simplesiomórfico. Por outro lado, a associação MMU-10/17 foi verificada apenas em ACU, considerada a espécie mais derivada dos akodontinos, o que caracterizaria ser um carácter apomórfico. Vale lembrar também, que estas sondas cromossomo-específicas MMU-10 e -17 foram as que apresentaram os maiores números de sinais, 4 e 9, respectivamente, dentre as espécies de akodontinos estudadas, o que pode sugerir estarem estes segmentos cromossômicos facilmente envolvidos em rearranjos e, neste caso, possa, então, ser considerados como um carácter antigo dentre os Muridae/Cricetidae.

Com o intuito de propor um cariótipo ancestral para os roedores, STANYON et al. (2004) apresentaram os dados de hibridação por ZOO-FISH com sondas de MMU em *Apodemus sylvaticus* (ASY), $2n = 48$, pertencente à subfamília Murinae, um roedor europeu considerado uma praga para a agricultura e reservatório natural de hantavirose (HUMAIR; RAIS; GERN, 1999; HEYMAN et al., 2002). Os dados de ASY mostraram 38 homeologias, sendo nove sentenias conservadas (MMU -3, -4, -6, -7, -9, -12, -14, -18 e -19) e nove associações (MMU-1/17, -2/10, -5/6, -5/11, -7/19, -10/17, -11/16, -12/17 e -13/15). Em posse destes dados os autores analisaram conjuntamente outras quatro espécies de roedores (MPL, RNO, RPU e CGR),

propondo que o cariótipo ancestral dos murídeos deveria ter tido 54 cromossomos, formado por segmentos homeólogos identificados como MMU: 1a, 1b/17a, 2a, 2b/13a, 3, 4, 5a, 5b/11, 6a, 6b, 7/19, 8a, 8b, 9, 10a, 10b/17b, 10c/17c, 11a, 11b/16a, 12a, 12/17d, 13b/15, 14, 15b, 16b, 18, X e Y. Novamente, verificou-se a presença da associação MMU-7/19, reforçando a idéia de ser um caráter simplesiomórfico dentre os Muridae/Cricetidae. Mais uma vez, constatamos que a ocorrência das associações MMU-10/17 e MMU-12/17 podem ser supostas apomorfias de ACU, sugerindo serem certos segmentos cromossômicos mais propensos a formar rearranjos que outros, podendo, assim, em determinado grupo estarem ausentes e reaparecerem em outros grupos. Proposta alternativa seria a da manutenção destas associações, em espécies mais derivadas e a perda em espécies ancestrais. Em relação ao cariótipo ancestral proposto, os nossos dados também indicam a integridade dos cromossomos MMU-4, -9, -14, -18, -19 e -X, estando os demais cromossomos envolvidos nos mais diversos tipos de arranjos como o proposto no cariótipo ancestral (ENGELBRECHT; DOBIGNY; ROBINSON, 2006).

Recentemente, dados de hibridação em *Otomys irroratus* (OIR), $2n = 28-29$, com sondas de MMU, mostraram 41 homeologias, sendo nove delas (MMU -3, -4, -6, -7, -11, -12, -14, -18 e -19) totalmente conservadas (ENGELBRECHT; DOBIGNY; ROBINSON, 2006). Ao comparem as associações sintênicas com dados da literatura, somente quatro (1a, 5b/11, 9 e 12/17d) não estavam presentes no cariótipo ancestral proposto por STANYON et al. (2004), sendo então consideradas autapomórficas para os Otomyini (OIR e RPU). Os dados dos Cricetidae por nós analisados, também confirmam a conservação dos MMU -4, -14, -18 e -19 podendo ser realmente conservações de grande relevância para a construção do cariótipo ancestral dos roedores. Vale lembrar aqui também que a associação sintênica MMU-12/17 foi verificada em ACU, o que pode significar uma forte evidência para a manutenção deste rearranjo no ancestral Murinae, mas que teria sido perdido em grande parte das linhagens dos Cricetidae atuais.

4. FILOGENIA DOS ROEDORES POR MEIO DA CITOGENÉTICA MOLECULAR

A partir do início da década de 90 e da publicação de MUSSER; CARLETON (1993), propondo serem os roedores da Subfamília Sigmodontinae como pertencentes à Família Muridae, surgiram diversos trabalhos que se preocuparam com o estudo filogenético dos roedores no geral e que, de certa forma, contribuíram ao esclarecimento do posicionamento dos Cricetidae e conseqüentemente dos Sigmodontinae (CATZEFLIS et al. 1993; STEPPAN, 1995; QUINTANA, 2002; STEPPAN; ADKINS; ANDERSON, 2004).

Na análise filogenética do presente trabalho, procuramos evidenciar as correlações entre as espécies através de quatro análises que visaram a obtenção de uma melhor topologia das árvores resultantes.

Quando obtivemos as filogenias que levaram em conta somente espécies por nós estudadas, porém analisadas com diferentes grupos externos, observamos que a árvore que contém CGR (Figura 25), Cricetidae do Velho Mundo, como grupo externo delimita melhor nossos dados, pois evidencia uma nítida separação das espécies do gênero *Akodon* mais *Necromys lasiurus* das demais estudadas. Assim, esta topologia está enfatizando a existência de um subgrupo akodontino bem definido dentre os demais, e que seria reflexo do alto grau de similaridade entre suas espécies, já proposto por vários autores (SBALQUEIRO, 1989; GEISE; CANAVEZ; SEUÁNEZ, 1998). Ou também, poderia refletir uma divergência parcial entre os roedores neotropicais e os do Velho Mundo, como verificado na politomia que une MMU e OSP. Os dados também apontam para a direção de que certas espécies neotropicais seriam as mantenedoras de formas antigas, das quais as mais derivadas teriam se diferenciado, como mostrado na separação do grupamento das espécies do gênero *Akodon* e *Necromys lasiurus*, consideradas espécies akodontinas mais derivadas. Outra observação é a de que para se obter uma filogenia mais consistente preconiza-se a utilização de um maior número de espécies, assim nossos dados poderiam também estar refletindo justamente o pequeno número de espécies (oito), o que acarretaria, de certa forma, uma não clareza nos dados obtidos. Desta forma, para que estas lacunas sejam sanadas vê-se a necessidade de mais estudos nesta área com um maior número de roedores

cricetídeos da América do Sul, bem como estudos com outras espécies que possam ser utilizadas como grupo externo.

As outras duas análises do trabalho levaram em conta os dados do presente trabalho e os publicados com espécies de roedores da Europa, Ásia e África, informações oriundas da aplicação da metodologia de ZOO-FISH com sondas de MMU, idênticas à metodologia aplicada em nossa amostra. Estes dados conjuntos, tendo como grupo externo MMU (Figura 24), evidenciaram a união de MPL com MMU, ambas do mesmo gênero. Na seqüência, verifica-se a união das espécies do gênero *Akodon* e *Necromys lasiurus* no mesmo ramo, como descrita nas análises anteriores. A surpresa ocorre quando as demais espécies de akodontinos (BGR, TNI e OSP) localizam-se próximas às espécies do Velho Mundo, no mesmo ramo. No entanto, as espécies do Velho Mundo (OIR, CGR, RPU, ASY e RNO) formam um subgrupo consistente. Isto pode estar revelando ou a incerteza do posicionamento de BGR, TNI e OSP, que com a adição de novas espécies poderia solucionar este problema, ou ser reflexo delas serem espécies mais primitivas de cricetídeos sul-americanos e, portanto, seus cariótipos mais próximos dos de roedores do Velho Mundo.

Já as análises utilizando CGR como grupo externo mostraram a separação das espécies da literatura, exceto por MMU, MPL e OIR, das oito espécies akodontinas. O ramo dos akodontinos mostra novamente a formação de um grupo com as espécies do gênero *Akodon* e *Necromys lasiurus*. Verifica-se também um posicionamento não definido de BGR, TNI e OSP.

Notamos de uma forma geral que, independentemente do grupo externo utilizado, todas as análises mostraram o agrupamento com as espécies do gênero *Akodon* e *Necromys lasiurus*, sugerindo serem estes os mais derivados dentre as espécies neotropicais estudadas. O posicionamento, não conclusivo, de BGR, TNI e OSP, poderia refletir a retenção de segmentos cromossômicos compartilhados entre estes e as espécies do Velho Mundo, pois se considera que estas são espécies mais correlacionadas com os Oryzomins, uma das formas que deram origem aos roedores da América do Sul, e que retêm características mais primitivas ou similares aos roedores murídeos.

O trabalho de CATZEFLIS et al., 1993, com roedores das subfamílias: Murinae, Gerbillinae, Cricetidae, Arvicolinae, Sigmodontinae, Neotominae e Spalacidae,

presenteou uma nítida separação entre os Murinae (*Mus*, *Apodemus* e *Rattus*), dos Cricetinae (*Cricetulus*) e dos Sigmodontinae (*Akodon* e *Oryzomys*). Esta proposta não foi verificada na filogenia por nós obtida a partir das hibridações com sondas cromossomo-específicas de MMU. Esta não concordância pode estar refletindo uma inconsistência de certos ramos das árvores, como é demonstrado pela ausência de um Bootstrap significativo, que não possibilita uma maior diferenciação das espécies.

No trabalho de STEPPAN; ADKINS; ANDERSON (2004), os autores procuraram caracterizar uma divergência e filogenia dos roedores Muroidea baseado em múltiplos dados de genes nucleares. Os resultados que os autores encontraram reforçam o modelo de Marshall (MARSHALL, 1979), que considera a entrada de um pequeno número de linhagens de roedores na América do Sul a aproximadamente 5 a 7 milhões de anos atrás, quando o nível do mar na ponte Panamenha estaria baixo. Eles sugerem que o ancestral roedor, identificado como *Oryzomyia* (novo táxon proposto), teria chegado na América do Sul a 6 milhões de anos, antes da formação do Istmo do Panamá.

Desta forma, a partir dos nossos dados, pode-se inferir que o tempo de diversificação entre MMU e os akodontinos poderia ser uma das possíveis explicações pela ocorrência de marcações inespecíficas entre as sondas de MMU e os cromossomos de akodontinos, juntamente com a velocidade de evolução cariotípica ocorrida neste grupo. Um caso contrário é verificado quando se utiliza sondas humanas para hibridar cromossomos de carnívoros ou sciurídeos, distantes evolutivamente a mais de 35 milhões de anos, porém durante este tempo poucos foram os processos que envolveram rearranjos cariotípicos, demonstrando uma alta conservação cariotípica mesmo em grupos mamíferos há tanto tempo divergentes (STANYON et al., 2003). Na tentativa de melhorar este conjunto de dados, preconizamos que novas análises em outros táxons seriam imprescindíveis para se obter respostas e sugerir modelos das radiações ocorridas durante as diferenciações dos cricetídeos e dos murídeos.

Recentemente, em um fórum sobre modelos de reconstrução do cariótipo ancestral mamífero, a partir de dados de citogenética molecular e de bioinformática com sequenciamento de genomas, houve uma ampla discussão e polêmicas conseqüentes. Desta forma, FROENICKE et al. (2006) consideraram o modelo da citogenética molecular como sendo mais representativo, pois compararam os

resultados de pintura cromossômica em mais de 80 espécies de euteria (RICHARD et al., 2003; WIENBERG, 2004; FROENICKE, 2005) e o confrontaram com o modelo proposto por HILLIER et al. (2004) e BOURQUE et al. (2005), que usaram dados de seqüências gênicas dos genomas de galinha, camundongo, rato e o homem com a identificação de 586 blocos sintênicos. O ancestral postulado pelos dados citogenéticos teria o número haplóide de 23 cromossomos, com a identificação de 32 segmentos conservados e oito sintenias, já os dados de seqüenciamento (modelo bioinformático) sugerem um cariótipo ancestral com o número haplóide de 21 cromossomos, com 56 segmentos conservados e 29 sintenias. Apesar dos números haplóides dos dois complementos serem parecidos as sintenias e os complementos conservados apresentaram-se bem discrepantes. Porém, LINDBLAD-TOH et al. (2005), ao compararem as seqüências genômicas de cachorro com os dados dos dois modelos, verificaram que seis das oito sintenias identificados no modelo citogenético permaneciam retidos nos alinhamentos de cachorro e humanos, mas nenhuma das 25 sintenias do modelo bioinformático foram confirmadas. Por este motivo, os autores aceitam que as discrepâncias verificadas entre os dois modelos se devem ao fato de existirem poucos dados de sequenciamento genômico e uma incapacidade das análises por algoritmos de identificar a variação evolutiva entre as linhagens. Se esses obstáculos forem resolvidos, os modelos citogenético e bioinformático poderão ser mais convergentes, e a integração destes dados o mais importante para a obtenção de um modelo genômico ancestral.

Em resposta às críticas de FROENICKE et al. (2006), BOURQUE; TESLER; PEVZNER (2006) admitem ser elegante a forma do modelo citogenético do ancestral mamífero, proposto pelos primeiros autores. Porém, apontam que as possíveis falhas deste modelo podem ser devidas à não identificação de pequenas associações cromossômicas, a partir de pintura cromossômica, e o não reconhecimento de inversões que podem ser importantes na evolução. Por outro lado, o modelo bioinformático poderia evidenciar detalhadamente os rearranjos envolvidos em linhagens que apresentam uma rápida taxa de evolução cromossômica, como são os casos dos roedores (BOURQUE; TESLER; PEVZNER, 2006) e dos carnívoros caniformes (MURPHY et al., 2005), recapitulando os passos que originaram os genomas modernos e estimar as taxas atuais de rearranjos.

Mesmo assim os autores admitem que as ambigüidades entre os modelos poderão ser minimizadas com o aumento de genomas analisados, e que uma melhor integração entre as técnicas poderia beneficiar a resolução de associações fracas verificadas nos rearranjos que envolvem a reconstrução do ancestral mamífero.

É importante salientar que ao compararmos nossos dados com os trabalhos de STANYON et al. (2003); FROENICKE et al. (2006) e BOURQUE; TESLER; PEVZNER (2006), notamos que uma associação cromossômica (HSA-4/8), seria concordante com a associação sintênica MMU-8/13 verificada em sete das oito espécies de akodontinos (ACU, AMO, APA, ASE, NLA, OSP e TNI) da presente amostra, podendo este dado reforçar a idéia de que esta associação tenha participado do cariótipo ancestral.

Salientamos que seria importante a realização de experimentos a partir da técnica de hibridação reversa, porém até o momento não dispomos de outras sondas cromossomo-específicas que sejam afins ao grupo de roedores akodontinos. Estas seriam relevantes para a confirmação principalmente, das sentenias verificadas, e poderiam evidenciar segmentos não observados com a utilização das sondas de MMU. Talvez estas sondas possam auxiliar a esclarecer com maior clareza as dificuldades encontradas nas filogenias geradas para este grupo.

Várias outras possibilidades de comparação de genomas poderiam ser interessantes na avaliação das relações filogenéticas dos roedores neotropicais, como por exemplo, estudos de comparação genômica através de análise CGH, ou identificações de genes clonados em YAC's que tenham sua localização bem determinada em outras espécies, podendo ser estes genes conjugados com sondas cromossomo-específicas, que facilitariam a correta localização na nova espécie estudada.

V. CONCLUSÕES

A utilização de sondas cromossomo-específicas de *Mus musculus* em roedores da Tribo Akodontini: *Akodon cursor*, *A. montensis*, *A. paranaensis*, *A. serrensis*, *Necomys lasiurus*, *Thaptomys nigrita*, *Oxymycterus* sp. e *Brucepattersonius griserufenscens*, e a comparação dos resultados publicados na literatura, permitiram as seguintes conclusões:

1. Os dados obtidos por hibridação *in situ* de sondas cromossômicas de MMU, apresentaram resultados satisfatórios quando da hibridação com espécies de roedores da Tribo Akodontini, ocorrentes na América do Sul;
2. Observou-se que as hibridações entre as diferentes espécies de roedores, mesmo que realizadas com sondas de roedor, apresentam maior dificuldade na produção de sinais, podendo esta ser devido à alta taxa de mutação genômica evidenciada no grupo de roedores;
3. Os resultados evidenciaram homeologias das sondas cromossômicas de MMU com todas as espécies estudadas;
4. Apenas duas espécies de roedores neotropicais não apresentaram hibridação com todas as sondas de MMU: sonda MMU-10 em ASE e sonda MMU-18 em BGR;
5. A espécie ASE não apresentou homeologia no par cromossômico 7 com nenhuma das sondas de MMU;
6. A espécie BGR não apresentou homeologia no par cromossômico 19 com nenhuma das sondas de MMU;

7. Foi confirmada a ocorrência de sintonias dos cromossomos MMU-4, -9, -14, -18 e -19 em todos os Akodontinos;
8. A associação sintênica MMU-7/19, também foi verificada entre os akodontinos;
9. Duas associações sintênicas, MMU-3/18 e -6/12, apresentaram-se como exclusivas das espécies do gênero *Akodon* e *Necomys lasiurus*;
10. A associação sintênica MMU-8/13, presente nos gêneros *Akodon* e *Necomys*, foi também verificada em *Oxymycterus*, revelando ser exclusiva de roedores akodontinos;
11. A associação cromossômica MMU-7/19 confirma a antiguidade desta, pois é também verificada em roedores murídeos e cricetídeos da Europa, Ásia e África;
12. As demais associações sintênicas confirmam os estados de caráter das homeologias por elas representadas, em relação ao cariótipo ancestral dos roedores;
13. Muitos dos rearranjos propostos na literatura para espécies de akodontinos, baseados em banda G, não apresentaram concordância com os dados originados pelo método de ZOO-FISH;
14. A homeologia do cromossomo ACU-1b com os cromossomos AMO-7, -8 e -9q corrobora os dados da literatura;
15. A ocorrência da associação sintênica MMU-7/19 entre as espécies de roedores akodontinos e as do Velho Mundo, evidenciando uma fusão cêntrica, altera o modelo cariotípico ancestral dos roedores, proposto na literatura pertinente;
16. A árvore filogenética envolvendo apenas as espécies de akodontinos e o grupo externo CGR foi a que apresentou maior consistência;

17. A árvore filogenética mais significativa, englobando tanto as espécies de akodontinos como as do Velho Mundo, foi a que teve como grupo externo MMU, no entanto refletiu uma falta de dados sobre um número maior de espécies de roedores;

18. Nas quatro árvores filogenéticas geradas, evidenciou-se uma forte ligação entre três das quatro espécies de *Akodon* (*A. cursor*, *A. montensis* e *A. paranaensis*).

19. *Necromys lasiurus*, em todas as filogenias geradas mostrou-se incluída entre as espécies de *Akodon*.

REFERÊNCIAS

AGUILERA, M., 1980. Analisis intragenérico de la evolución cromosómica em alguns grupos de mamíferos. In: REIG, O. A. **Ecología y genética de especiación animal**. Caracas, Equinoccio, c1980. P. 191-209 (Universidad Simon Bolivar. Simposia).

AGUILERA, M.; PEREZZAPATA, A.; MARTINO, A. Cytogenetics and karyosystematics of *Oryzomys albigularis* (Rodentia, Cricetidae) from Venezuela. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 69, p. 44-49, 1995.

AMORIM; D. S. **Elementos básicos de Sistemática Filogenética**. 2ª. Ed. Ribeirão Preto, Holos, Editora e Sociedade Brasileira de Entomologia, 1997.

ANDERSON, S.; JONES JR., J. K. **Recent Mammals of the world. A synopsis of families**. New York, the Ronald press Company, p. 3 –11, 1967.

ANDRADES-MIRANDA, J.; NUNES, A.P.; OLIVEIRA, L.F.B.; MATTEVI, M.S. The karyotype of the South American rodent *Kansia tomentosus* (Lichtenstein, 1830). **Cytobios.**, v. 98, p. 137-147, 1999.

ARNOLD N; STANYON R; JAUCH A.; O`BRIEN, P.; WIENBERG, J. Identification of complex chromosome rearrangements in the gibbon by FISH of a human chromosome 2q microlibrary, yeast artificial chromosomes and reciprocal chromosome painting. **Cytogenet Cell Genet**, v. 74, p. 80–85, 1996.

BAKER, R. J. ; KOOP, B. F.; HAIDUK, M. W. Resolving systematic relationships With G bands: A study of five genera of South American cricetine rodents. **Syst. Zool.**, v.32, p. 403, 16, 1983.

BAKER, R. J.; QUIMISYEH, M.B.; HOOD, C.S. Role of chromosomal banding patterns in understanding mammalian evolution. In: GENOWAYS, H.H. **Current Mammalogy**, v. 1, p. 67-89, 1987.

BIANCHI, N. O.; REIG, O. A.; MOLINA, O. J. et al. Cytogenetics of the South American Akodont rodents (Cricetidae). I. A progress report of Argentinian and Venezuelan forms. **Evolution**, v. 25, p. 724-736, 1971.

BONHOMME, F.; GUÉNET, J-L. The laboratory mouse and its wild relatives. In: LYON, M.F.; RASTAN, S.; BROWN, S.D.M., eds. **Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse**. Oxford, UK: Oxford, University Press, p. 1577-1596. 1996.

BONNET-GARNIER, A.; CLARO, M.; THÉVENOUN, S.; GAUTIER, M.; HAYES, H. Identification by R-banding and FISH of chromosome arms involved in Robertsonian translocations in several deer species. **Chromosome Research.**, v. 11, p. 649-663, 2003.

BONVICINO, C. R.; PENNA-FIRME, V.; SEUÁNEZ, H. N. The karyotype of *Bucepattersonius griscerufescens* Herzkovitz, 1998 (Rodentia, Sigmodontinae) with comments on distribution and taxonomy. **J. of Mamm. Biology**, v. 63, p. 329-335, 1998.

BOURQUE, G.; ZDOBNOV, E.M.; BORK, P.; PEVZNER, P.A.; TESLER, G. Comparative architectures of mammalian and chicken genomes reveal highly variable rates of genomic rearrangements across different lineages. **Genome Res.**, v. 15, p. 98-110, 2005.

BOURQUE, G.; TESLER, G.; PEVZNER, P.A. The convergence of cytogenetics and rearrangement-based models for ancestral genome reconstruction. **Genome Research.**, v. 16, p. 311-313, 2006.

BUSH, G. L.; CASE, S. M.; WILSON, A. C. e PATTON, J. L. Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. **Proc. Nat. Acad. Sci, USA**, v. 74, p. 3942-6, 1977.

CABRERA, A. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. **Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat.**, v. 4, p. 451, 1961.

CAMIN, J. H. ; SOKAL, R. R. A method for deducing branching sequences in phylogeny. **Evolution** , v.19, p. 311-26, 1965.

CARTAYA, E.; AGUILERA, M. Estudio de la comunidad de roedores; plaga asociada a um cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) a lo largo de su ciclo de vida en el estado de Portuguesa, Venezuela. **Cong. Lat. Zool., G. Arequipa**. Resumos, 1983.

CARTER, N.P.; FERGUSON-SMITH, M.A.; PERRYMAN, M.T. et al. Reverse chromosome painting: a method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. **J Med Genet**, v. 29, p.229-307, 1992.

CARVALHO, B. A.; MATTEVI, M. S. (T₂AG₃)_n telomeric sequence hybridization suggestive of centric fusion in karyotype marsupials evolution. **Genetica**. v. 108, p. 105-210, 2000.

CASTRO, E. C.; MATTEVI, M. S.; MALUF, S. W.; OLIVEIRA, L. F. B. Distinct centric fusions in different populations of *Deltamys kempi* (Rodentia, Cricetidae) from South America. **Cytobios**, v. 68, p. 153-159, 1991.

CATZEFLIS, M.D.; DICKEMANN; A.W.; MICHAUX, J.; KIRSH, J.A.W. DNA hybridization and rodents phylogeny. **Mammalian phylogeny: Placentals**. Springer-Verlag, New York, p. 159-172, 1993.

CAVAGNA, P.; STONE, G.; STANYON, R. Black rat (*Rattus rattus*) genomic variability characterized by chromosome painting. **Mamm. Genome.**, v. 13, p. 157-163, 2002.

CGOW (COMPARATIVE GENOME ORGANIZATION OF VERTEBRATES: FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP). **Mamm Genome**, v. 7, p. 717-734, 1996.

CHALINE, J ; MEIN, P.; PETTER, F. Les grandes lignes d'une classification evolutive des Muroides. **Mammalia**, v. 41, p. 245-252, 1977.

CRISTOFF, A.U.; FAGUNDES, V.; SBALQUEIRO, I.J.; MATTEVI, M.S.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Description of a new species of *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from Southern Brazil. **J. Mammalogy**, v. 81, n. 3, 838-851, 2000.

D'ELIA, G. Comments on recent advances in understanding sigmodontine phylogeny and evolution. **Mastozoologia Neotropical.**, v. 7, p. 47-55, 2000.

D'ÉLIA, G. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. **Cladistics**. v. 19, p. 307-323. 2003.

D'ÉLIA, G., PARDIÑAS, U.; SALAZAR, J.; JAYAT, P. Límites de especies y relaciones filogenéticas dentro del género *Necomys* (Cricetidae, Sigmodontinae, Akodontini): evidencia molecular. **Livro de Resumos. III Congresso Brasileiro de Mastozoologia**, 2005.

DE OLIVEIRA, E.H.C. (1996). **Estudos citogenéticos e evolutivos nas espécies brasileiras e argentinas do gênero *Alouatta* (Atelidae, Platyrrhini)**. Curitiba, PR, Brasil, 1996. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.

DE OLIVEIRA, E.H.C., NEUSSER, M.; FIGUEIREDO, W. B.; NAGAMACHI, C.; PIECZARKA, J.C.; SBALQUEIRO, I.J.; MÜLLER, S. The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): Reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. **Chromosome Research**. v. 10, 669-683, 2002.

DE OLIVEIRA, E.H.C., NEUSSER, M.; PIECZARKA, J.C.; NAGAMACHI, C.; SBALQUEIRO, I.J.; MÜLLER, S. Phylogenetic inferences of Atelinae (Platyrrhini) based on multi-directional chromosome painting in *Brachyteles arachnoides*, *Ateles paniscus paniscus* and *Ateles b. marginatus*. **Cytogenet Genome Res.**, v. 108, p. 183-190, 2005a.

DE OLIVEIRA, E.H.C.; HABERMANN, F.A.; LACERDA, O.; SBALQUEIRO, I.J.; WIRNBERG, J.; MÜLLER, S. Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotype of the world's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to the chicken (*Gallus gallus*). **Chromosome.**, 2005b.

DE OLIVEIRA, E.H.C.; SBALQUEIRO, I.J.; LIMA, M.M.C.; PISSINATI, A. The karyotype of *Alouatta fusca* from Rio de Janeiro, Brazil: Evidence of a Y-autosome translocation. **Genet. Mol. Biol.**, v. 21, n. 3, p. 361-364, 1998.

DIAS, L. C. S.; PIRES, F. D. A.; PINTO, A. C. W. Parasitological and ecological aspects of *Shistosomiasis mansoni* in the valley of the Paraíba do Sul river (São Paulo State, Brazil) 1: Natural infection of small mammals with *Schistosoma mansoni*. **Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, p. 496-500, 1980.

DUTRILLAUX, B. Chromosome evolution in primates. **Folia Primatol**, v. 50, p. 134-135, 1988.

ENGELBRECHT, A.; DOBIGNY, T.; ROBINSON, T. J. Further insights into the ancestral murine karyotype: the construction of the *Otomys-Mus* comparison using chromosome painting. **Cytogenet Genome Res.**, v. 112, 126-130, 2006.

ESPINOSA, M.B.; REIG, O.A. Cytogenetics and karyosystematics of South American Oryzomyine rodents (Cricetidae, Sigmodontinae) III. Banding karyotypes of Argentinian *Oligoryzomys*. **Z. Säugetierk.**, v. 56, p. 306-317, 1991.

ESCUTENAIRE, S.; CHALON, P.; VERHAGEN, R. et al. Spatial and temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in reservoir vole (*Clethrionomys glareolus*) populations in Belgium. **Virus Research**, v. 67, n. 1, p. 91-107, 2000.

FAGUNDES, V.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Telomeric sequences localization and G-banding patterns in the identification of a polymorphic chromosomal rearrangement in the rodent *Akodon cursor* ($2n = 14, 15$ and 16).

Chromosome Research. v. 5, p. 228-232, 1997a.

FAGUNDES, V.; SCALZI-MARTIN, J. M.; SIMS, K. et al. ZOO-FISH of a microdissection DNA library and G-banding patterns reveal the homeology between the Brazilian rodents *Akodon cursor* and *A. montensis*. **Cytog. Cell Genet.**, v. 78, p. 224-228, 1997b.

FAGUNDES, V.; CHRISTOFF, A. U.; YONENAGA-YASUDA, Y. Extraordinary chromosomal polymorphism with 28 different karyotypes in the neotropical species *Akodon cursor* (Muridae, Sigmodontinae), one of the smallest diploid number in rodents ($2n = 16, 15$ and 14). **Hereditas**. V. 129, p. 263-274, 1998a.

FAGUNDES, V.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Evolutionary conservation of whole homeologous chromosome arms in the Akodont rodents *Bolomys* and *Akodon* (Muridae, Sigmodontinae): maintenance of interstitial telomeric segments (ITBs) in recent event of centric fusion. **Chromosome Research**, v. 6, p. 643-648, 1998b.

FARRIS, J. S. Methods for computing Wagner tress. **Syst. Zool.** , v.19, p. 83 92, 1970.

FELSENSTEIN; J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution.**, v. 38, p. 783-791, 1985.

FERGUSON-SMITH M.A.; YANG F.; O'BRIEN P.C.M. Comparative mapping using chromosome sorting and painting. **ILAR Journal**, v. 39, p. 68-76, 1998.

FORD, C.E. ; HAMERTON, J. L. A cochicine hypotonic citrate squash sequence for mammalian chromosome. **Stain Tech.**, v. 31, p. 247-51, 1956.

FROENICKE, L. Origins of primate chromosomes-as delineated by Zoo-FISH and alignments of human and mouse draft genome sequences. **Cytogenet Genome Res.**, v. 108, p. 122-138, 2005.

FROENICKE, L.; CALDÉS, M.G.; GRAPHADATSKY, A.; MÜLLER, S.; LYONS, L.A.; ROBINSON, T.J.; VOLLETH, M.; YANG, F.; WIENBERG, J. Are molecular cytogenetics and bioinformatics suggesting diverging models of ancestral mammalian genomes? **Genome Research.**, v. 16, p. 306-310, 2006.

FRONICKE, L.; CHOWDHARY, B.P.; SCHERTHAN, H.; GUSTAVSSON, I. A comparative map of the porcine and human genomes demonstrates ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies. **Mamm Genome.**, v. 7, p. 285-290, 1996.

FRONZA, T. M. L. G.; WAINBERG, R. L.; CATALFO, G. E. H. Multiple sex chromosomes in *Deltamys kempi* (Rodentia, Cricetidae): preliminary steps towards the establishment of the XY₁Y₂/XX system. **Caryologia**, v. 34, n. 4, p. 457-466, 1981.

GALLARDO, M. H.; BICKHAM, J. W.; HONEYCUTT, R. L.; et al. Discovery of tetraploidy in a mammal. **Nature**, v. 401, p. 341, 1999.

GARDENAL, C.N. Niveles de migración en roedores reservorio de virus: aportes de la genética de poblaciones. **Libro de Resúmenes. XX Jornadas Argentinas de Mastozoología.** 2005.

GARDNER, A. L.; PATTON, J. L. Karyotypic variation in oryzomyine rodents (Cricetinae) with comments on chromosomal evolution in the neotropical cricetine complex. **Occas. Pap. Mus. Zool.**, v. 49, p. 1-48, 1976.

GEISE, L.; CANAVEZ, F. C.; SEUÁNEZ, H. N. Comparative karyology in *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae) from Southeastern Brazil. **Heredity**, v. 89, p. 158-163, 1998.

GOHL, R.; PARESQUE, R.; FAGUNDES, V. Polimorfismo das regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RON) em *Necromys lasiurus* (Rodentia, Sigmodontinae). **Livro de Resumos. III Congresso Brasileiro de Mastozoologia**, 2005.

GOMES, J.A.; MOURA, R.T.; CHRISTOFF, A.U.; FAGUNDES, V. Análise de haplótipos de polimorfismo de fragmentos de restrição espécie-específicos em dois táxons de roedores do gênero *Thaptomys* com $2n=52$ e $2n=50$. **Livro de Resumos. III Congresso Brasileiro de Mastozoologia**, 2005.

GOUREAU, A.; YERLE, M.; SCHMITZ, A. et al. Human and porcine correspondence of chromosome segments using bidirectional chromosome painting. **Genomics**, v. 36, p. 252-262, 1996.

GRAY, J.W.; LANGLOIS, G.; CARRANO, A. et al. High resolution chromosome analysis: one or two parameter flow cytometry. **Chromosoma**, v. 73, p.9-27, 1979.

GREENBAUM, I. F. ; BAKER, R. J. Determination of the primitive karyotype form *Peromyscus*. **J. Mamm.**, p.59, p. 820-34, 1978.

GUILLY, M.N.; FOUCHET, P.; de CHAMISSO, P.; SCHMITZ, A.; DUTRILLAUX, B. Comparative karyotype of rat and mouse using bidirectional chromosome painting. **Chromosome Research.**, v. 7, p. 213-221, 1999.

GUERRA, M. **FISH - conceitos e aplicações na citogenética**. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, p. 184, 2004.

GYLDENSTOLPE, N. A manual of neotropical sigmodont rodents. **Kungl. Svenska Vet. Akad Handl.**, v. 11, p. 1-164, 1932 .

HAMEISTER, H.; KLETT, C.; BRUCH, J.; DIXKENS, C.; VOGEL, W.; CHRISTENSEN, K. Zoo-FISH analysis: the American mink (*Mustela vison*) closely resembles the cat karyotype. **Chromosome Research.**, v. 5, p. 5-11, 1997.

HASS, I. **Estudos citogenéticos e evolutivos de roedores do gênero *Akodon* (Rodentia, Cricetidae), ocorrentes no Estado do Paraná.** Curitiba, 1997. Monografia Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

HASS, I. **Polimorfismo anônimo de DNA em seis espécies de *Akodon* (Rodentia, Muridae), da região Sul do Brasil.** Curitiba, 2001. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.

HAYES, H. Chromosome painting with human chromosome specific paints reveals the extent and distribution of conserved segments in bovine chromosomes. **Cytogenet Cell Genet.**, v. 71, p. 168-174, 1995.

HENNING, W. Phylogenetic systematics. **Ann. Rew. Entom.**, v.10, p. 97-116, 1965.

HERSHKOVITZ, P. The evolution of mammals on southern continents. VI . The recent mammals of the Neotropical Region: a zoogeographical and ecological review. **Quart. Rev. Biol.**, v. 44, p. 1-70, 1969.

HERSHKOVITZ, P. The recent mammals of the Neotropical Region: A zoogeographic and ecological review. In: KEAST, A.; ERK, F.C.; GLASS, B. eds., **Evolution, mammals and Southern continents.** Albany, State University of New York Press, 311-432.1972.

HERSHKOVITZ, P. Report on some sigmodontinae rodents collected in southeastern Brazil with descriptions of a new genu and six new species. **Bonn. Zool. Beitr.**, Bd. 47, H. 3-4, p. 193-256, 1998.

HEYMAN, P.; VAN MELE, R.; JAEGERE, F.; KLINGSTROM, J.; VANDENVELDE, C.; LUNDKVIST, A.; ROZENFELD, F.; ZIZI, M. Distribution of hantavirus foci in Belgium. **Acta. Trop.**, v. 84, p. 183-188, 2002.

HILLIER, L.W.; MILLER, W.; BIRKNEY, E.; WARREN, W.; HARDISON, R.C.; PONTING, C.P.; BORK, P.; BURT, D.W.; GROENEN, M.A.; DELANY, M.E.; et al. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature.**, v. 432, p. 695-716, 2004.

HILLIS; D.M.; BULL, J.J. An empirical test to bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. **Systematic Biology.**, v. 42, p. 182-192, 1993.

HOOPER, E. T.; MUSSER, G. G. The glans penis in neotropical cricetines (Family Muridae) with comments on classification of muroid rodents. **Misc. Publ. Mus. Zool. Univ. Mich.**, v.123, p. 1-57, 1964.

HUMAIR, P.F.; RAIS, O.; GERN, L. Transmission of *Borrelia afzelli* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. **Parasitology.**, v. 118 (Pt 1), p. 33-42, 1999.

JACOB, J. Rodents in agro-ecosystems. **Libro de Resúmenes. XX Jornadas Argentinas de Mastozoología.** 2005.

JOHNSON, A. M.; DE SOUZA, L. T. M.; FERREIRA, I. B. et al. Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. **J. Med. Virol.**, v. 59, n. 4, p. 527-535, 1999.

KASAHARA, S.; YONENAGA-YASSUDA, Y. A progress report of cytogenetic data on Brazilian rodents. **Rev. Bras. Genet.**, v. 7, n. 3, p. 509-533. 1984.

KING, M. **Species Evolution: The Role of Chromosome Changes.** Cambridge, Cambridge University Press, 1993.

KLUGE, A. G. ; FARRIS, J. S. Quantitative phyletics and the evolution of Anurans. **Syst. Zool.** , v. 18, p. 1-32, 1969.

KOOP, B.F.; BAKER, R. J.; HAIDUIK, M. W.; ENGSTROM, M. D. Cladistical analysis of primitive G-band sequences for the karyotype of the ancestor of the Cricetidae complex of rodents. **Genetica**, v. 64, p.199 -208, 1984.

KUROIWA, A.; TSUCHIYA, K.; WATANABE, T. et al. Conservation of the rat X chromosome gene order in rodent species. **Chromosome Res.**, v. 9, p. 61-67, 2001.
LANDRY JUNIOR, S. A. The rodentia as omnivores. **Quart. Rev. Biol.**, v. 45, p. 351-72, 1970.

LEE, C.; SASI, R.; LIN, C.C. Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotypic evolution of the Asian muntjacs. **Cytogenet Cell Genet.**, v. 63, p. 156-159, 1993.

LEITCH, A.R.; SCHWARZACHER, T.; JACKSON, D.; LEITCH, I.J. **In situ – Hybridisierung**. Spektrum, Akad Verlag, 1994, 144p.

LI, W.H. Molecular evolution. Sunderland, Mass.: Sinauer, Associates. 1997.

LIASCOVICH, R. C. et al. Multiple autosomal polymorphism in populations of *Akodon simulator simulator* Thomas, 1916 from Tucuman, Argentina (Rodentia, Cricetidae). **Genetica**, v. 180, p. 165-175, 1990.

LINDBALD-TOH, K.; WADE, C.M.; MIKKELSEN, T.S.; KARISSEN; E.K.; JAFFE, D.B.; KAMAL, M.; CLAMP, M.; CHANG, J.L.; KULBOKAS, I.I.I.; ZODY, M.C.; et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature.**, v. 438, p. 803-819, 2005.

LOZADA, M.; GUTHMANN, N.; BACCALA, N. Microhabitat selection of five sigmodontine rodents in a forest-steppe transition zone in northwestern Patagonia. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 35, n. 2, p. 85-90, 2000.

LÜDECKE, H.J.; SENGER, G.; CLAUSSEN, U.; HORTHEMKE, B. Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. **Nature**, v. 338, p. 348-350, 1989.

MADDISON, W.P. Outgroups analysis and parcimony. **Syst Zool**, v. 33, p. 83-103, 1984.

MAIA, V.; LANGGUTH, A. New karyotypes of Brazilian akodont rodents with notes on taxonomy. **Z. Säuget**, v.46, p. 241, 1981.

MARES, M. A.; BRAUN, J. K. Three new species of *Brucepattersonius* (Rodentia: Sigmodontinae) from Misiones Province, Argentina. **Occasional Papers Oklahoma Mus. of Nat. Hist.**, n. 9, p. 1 – 13, 2000.

MARSHALL, L.G. A model of paleobiogeography of South American cricetine rodents. **Paleobiology**. v. 5, p. 126-132. 1979.

MARTINO, Á.M.G.; FILIPPUCCI, M.G.; CAPANNA, E. Evolutive pattern of *Calomys hummelicki* (Husson 1960: Rodentia, Sigmodontinae) inferred from cytogenetic and allozymic data. **J. Neotrop. Mammal.**, v. 9, n. 2, p. 187-197, 2002.

MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto, Holos, Editora e Sociedade Brasileira de Entomologia, 2001.

MATSUBARA, K.; NISHIDA-UMEHARA, C.; KUROIWA, A.; TSUCHIYA, K.; MATSUDA, Y. Identification of chromosome rearrangements between the laboratory mouse (*Mus musculus*) and the Indian spiny mouse (*Mus platythrix*) by comparative FISH analysis. **Chromosome Research**., v. 11, p. 57-64, 2003.

MATSUBARA, K; NISHIDA-UMEHARA, C; TSUCHIYA, K; NUKAYA, D; MATSUDA, Y. Karyotypic evolution of *Apodemus* (Muridae, Rodentia) inferred from comparative FISH analyses. **Chromosome Research**, v. 12, p. 383-395, 2004.

MAYR, E. Species, speciation and chromosomes . In: BENIRSCHKE, K. ed. **Comparative mammalian cytogenetics**. Berlin, Springer-Verlag. p. 1-7, 1969.

MAYR, E. **Populações, espécies e evolução**. São Paulo, Ed. Universal. v. 5, 485p., 1977.

McKENNA, M. C. Toward a phylogenetic classification of the Mammalia. In: LUCKETT, W. P. and SZALAY, F. S. eds. **Phylogeny of the Primates**. New York, Plenum Publ. Co. p. 21- 46, 1975.

MELLO, D. A. Estudos sobre o ciclo biológico de *Holochilus brasiliensis* (Cricetidae, Rodentia) em laboratório. **Bol. Mus. Paraense Emílio Goeldi**, v. 2, n. 2, p. 181-192, 1986.

MILAN, D.; RIQUET, J.; YERLE, M. Homologous and heterologous FISH painting with PARM-PCR chromosome –specific probes in mammals. **Mammalian Genome.**, v. 7, p. 194-199, 1996.

MODI, W. S. Phylogenetic analyses of chromosomal banding patterns among the Nearctic Arvicolidae (Mammalia: Rodentia). **Syst. Zool.** , v. 36, p. 109- 136, 1987.

MOOJEN, J. **Os roedores do Brasil**. Instituto Nacional do Livro, Rio de Janeiro, 1952.

MORAES NETO, A H.; LANFREDI, R.M.; de SOUZA, W. Emended description of *Litomosoides silvai* (Nematoda: Filarioides) of *Akodon cursor* (Rodentia: Muridae). **Parasitol**, v. 82, n. 6, p. 988-991, 1996.

MORAES NETO, A. H.; LANFREDI, R.M.; de SOUZA, W. *Litomodoides chagasfilhoi* sp. Nov. (Nematoda: Filarioidea) parasiting the abdominal cavity of *Akodon cursor* (Winde, 1887) (Rodentia: Muridae) from Brazil. **Parasitol**, v. 83, n. 2, p. 137-143, 1997.

MÜLLER, S.; O' BRIEN, P.C.M.; FERGUSON SMITH, M.A.; WIENBERG, J. A novel source of highly specific chromosome painting probes derived from primate chromosomes for human karyotype analysis. **Hum Genet**, v. 101, p. 149-153, 1997.

MÜLLER, S; NEUSSER, M; WIENBERG, J. Towards unlimited colors for fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Chromosomr Research**, v.10, p. 223-232, 2002.

MURPHY, W.J.; LARKIN, D.M.; EVERTS-VAN DER WIND, A.; BOURQUE, G.; et al. Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps. **Science**, v. 309, p. 613-617, 2005.

MURÚA, R.; PADULA, P. Ecologia y transmision del hantavirus en Argentina y Chile. **Libro de Resúmenes. XX Jornadas Argentinas de Mastozoologia**. 2005.

MUSSER, G. G.; CARLETON, M. D. Family Muridae. In: D. E. WILSON and D. M. REEDER, **Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference**. 2nd ed. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1993.

NACHMAN, M.W.; SEARLE, J.B. Why is the house mouse karyotype so variable? **Tree**, v. 10, n. 10, p. 397-402, 1995.

NAPP, D. S. Relações filogenéticas entre as subfamílias de Cerambycidae (Coleoptera). 1990. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

NELSON, G.L ; PLATNICK, N.I. **Systematics and Biogeography: Cladistics and Vicariancy**. New York, Columbia University Press, 1981.

NOGUEIRA, C.D.A.; FAGUNDES, V. Variação genética em *Akodon cursor* (Rodentia, Sigmodontinae) revela dois clados distintos do Nordeste e do Sul-Sudeste com $2n=14$, 15 e 16. **Livro de Resumos. III Congresso Brasileiro de Mastozoologia**, 2005.

NOWAK; R.M. **Walkers' Mammals of the World**. 6th ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, 2 vol., p.1936.

NOWAK, R. M.; PARADISO, J. L. **Walkers' Mammals of the World**. 4th ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London, 1983.

OLIVEIRA, R.C.; LIMA, D.I.F.; CALDAS, A.C.S.; et. al. Estudo sobre a ecologia e parasitismo de pequenos mamíferos em área endêmica de hantavirose. **Livro de Resumos. III Congresso Brasileiro de Mastozoologia**, 2005.

PARDIÑAS, U.F.J.; D'ELIA, G. ORTIZ, P.E. Sigmodontinos fósiles (Rodentia, Muroidea, Sigmodontinae) de América Del Sur: Estado actual de su conocimiento y prospectiva. **Mastozoologia Neotropical**, v. 9, n. 2, 209-252, 2002.

PATTERSON, B. D. Accumulating knowledge on the dimensions of biodiversity: systematic perspectives on Neotropical mammals. **Biodiversity Letters**, v. 2, p. 79-86, 1994.

PATTERSON, B. D. The 'species alias' problem. **Nature**, v.380, p. 589, 1996.

PATTERSON, B. D. Patterns and trends in the discovery of New Neotropical mammals. **Diversity and Distributions**, v. 6, p. 145-151, 2000.

PATTERSON, B.D. On the continuing need for scientific collecting of Mammals. **J. Neotrop. Mammals**, v. 9, n. 2, 253-262, 2002.

PATTERSON, B.; PASCUAL, R. Evolution of mammals on southern continents. V. The fossil mammal fauna of South America. **Quart. Rev. Biol.**, v. 43, 409-451.1968.

PATTERSON, B.; PASCUAL, R. The fossil mammal fauna of South America. In: KEAST, A.; ERK, F.C.; GLASS, B. eds. **Evolution, Mammals, and Southern Continents**. Albany, State University of New York Press. p. 247-309. 1972.

QUINTANA, C.A. Roedores cricetídeos del Sanandresense (Plioceno Tardío) de La Provincia de Buenos Aires. **Mastozoologis Neotropical.**, v. 9, n. 2, 263-275, 2002.

QUMSIYEH, M.B.; BAKER, R.J. Comparative cytogenetics and Determination of primitive karyotypes. **Cytogenet. Cell. Genet.** , v. 47, p. 100-103, 1988.

RAMBAU, R. V.; ROBINSON, T. J. Chromosome painting in the African four-striped mouse *Rhabdomys pumilio*: Detection of possible murid specific contiguous segment combination. **Chromosome Research.**, v. 11, p. 91-98, 2003.

REIG, O. A. A proponded unified nomenclatura for the enamebled components of the molar teeth of the Cricetidae (Rodentia). **J. Zool.**, v. 181, p. 227-241, 1977.

REIG, O. A. Roedores cricetídeos del Plioceno Superior de la ProvinciadeBuenos Aires (Argentina). **Mus. Munic.Cienc. Nat. “Lorenzo Scallia”**. v. 2, p. 164-190. 1978.

REIG, O. A. A new fossil genus of South American cricetid rodents allied to *Wiedomys*, whit an assessment of the Sigmodontinae. **J. Zool.**, v.192, p. 257-281, 1980.

REIG, O. A. Teoria del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de America del Sur. **Mus. Munic. Cienc. Nat. “Lorenzo Scaglia”**, v. 1, p. 1-161, 1981.

REIG, O. A. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sul americanos (Cricetidae: Sigmodontinae). **Braz. J. Genet.**, v. 7, p. 333-65, 1984.

REIG, O. A. An assessment of the systematics and evolution of the Akodontini, with the description of new fossil species of *Akodon* (Cricetidae: Sigmontinae). **Fieldiana Zool.**, v. 39, p. 347-99, 1987.

REISEBERG, L.H. Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16(7), p. 351-356, 2001.

RETTENBERGER, G.; KLETT, C.; ZECHNER, U.; KUNZ, K.; HAMEUSTER, H. Visualization of the conservation synteny between human and pigs by heterologous chromosomal painting. **Genomics**, v. 27, p. 48890-48896, 1995.

RICHARD, F.; LOMBARD, M.; DUTRILLAUX, B. Reconstruction of the ancestral karyotype of eutherian mammals. **Chromosome Res.**, v. 11, 605-618, 2003.

RIESEBERG, L.H. Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 7, p. 351-356, 2001.

ROWE, T. Phylogenetic Systematics and the early History of Mammals. **Mammals Phylogeny Congress, I**. Szalay, F.S.I.; II. Novacek, M.J.; III. McKenna, M.C.; NATO, 1993. V.1. Mesozoic differentiation, multituberculates, monotremes, early therians and marsupials. Cap. 10, 129-145.

SAVAGE, J.M. The isthmian link and evolution of Neotropical mammals. **Nat. Hist. Mus. Los Angeles Country**, v. 260, p. 1-51. 1974.

SARAGE, R.J.G.; LONG, M.R. **Mammal Evolution**. British Museum (Natural History). Cromwell Road, London, 259p., cap.9, p. 113-129.1986.

SBALQUEIRO, I.J.; MATTEVI, M.S.; OLIVEIRA, L.F.B. An $X_1 X_1 X_2 X_2 / X_1 X_2 Y$ mechanism of sex determination in South American rodent, *Deltamys kemp* (Rodentia, Cricetidae). **Cytog. Cell Genet.**, v. 38, p. 50-55, 1984.

SBALQUEIRO, I. J. Análises cromossômicas e filogenéticas em algumas espécies de roedores da Região Sul. Porto Alegre, 1989. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SBALQUEIRO, I. J.; NASCIMENTO, A. P. Occurrence of *Akodon cursor* (Rodentia, Cricetidae) with 14, 15 and 16 cromossome cytotypes in the same geographic area in Southern Brazil. **Braz. J. Genet.**, v. 19, n. 4, p. 565-569, 1996.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, P. **Practical in situ hibridization**. Sprng-Verlag. NY., p. 203, 2000.

SILVA, F. Mamíferos silvestres do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, **Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul**, 246p., 101 fot., 4 des. (Publicações Avulsas FZB, n.7), 1984.

SILVA, M. J. de J.; YONENAGA-YASSUDA, Y. Karyotype and chromosomal polymorphism of an undescribed *Akodon* from Central Brazil, a species with the lowest known diploid chromosome number in rodents. **Cytog. Cell Genet.**, v. 81, p. 46-50, 1998.

SILVA, M.J.J. **Estudos dos processos de diferenciacao cariotípica, baseado em citogenética convencional e molecular, em quatro gêneros de roedores brasileiros**. São Paulo, 1999. 141p. Tese Doutorado em Ciências – Depto. Biologia, Universidade de Sao Paulo.

SIMPSON, G. G. The principles of classification and a classification of mammals. **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.**, v.85, p. 1-350, 1945.

SMITH, M. F.; PATTON, J. L. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American Akodontine Rodents (Muridae, Sigmodontinae). **Mol. Biol. Evol.**, v. 8, p. 85-103, 1991.

SPEICHER, M.R.; DU MANOIR, S.; SCHROCK, E., et al. Molecular cytogenetics analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. **Hum. Mol. Genet.**, v. 2, p. 1907-1914, 1993.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. The principles and practice of numerical classification. San Francisco, W.H. Freeman and Company, 572p., 1973.

STANYON, R.; STONE, G.; GARCIA, M.; FROENICKE, L. Reciprocal chromosome painting shows that squirrels, unlike murid rodents, have a highly conserved genome organization. **Genomics**, v. 82, p. 245-249, 2003.

STANYON, R.; YANG, F.; CAVAGNA, P.; O'BRIEN, P. C. M.; BAGGA, M.; FERGUSON-SMITH, M.A.; WIENBERG, J. Reciprocal chromosome painting shows that genomic rearrangements between rat and mouse proceed ten times faster than between humans and cats. **Cytog. Cell Genet.**, v. 84, p. 150-155, 1999.

STANYON, R.; YANG, F.; MORESCALCHI, A. M.; GALLEN, L. Chromosome painting in the long-tailed field mouse provides insights into the ancestral murid karyotype. **Cytogenet Genome Res.**, v. 105, p. 406-411, 2004.

STEPPAN, S.J. Revision of the Tribe Phyllotini (Rodentia: Sigmodontinae), with a Phylogenetic hypothesis for the Sigmodontinae. n.80, p. 1-112, 1995.

STEPPAN, S.J. **Tree of life: Muridae: Sigmodontinae** (<http://www.nmnh.si.edu/tol/muridae/sigmodontinae.html>).

STEPPAN, S.J.; ADKINS, R.M.; ANDERSON, J. Phylogeny and divergence-time estimates of rapid radiation in muroid rodents based on multiple nuclear genes. **Syst. Biol.**, v. 53, n. 4, 533-553, 2004.

SVARTMAN, M.; ALMEIDA, E. J. C. Robertsonian fusion and X chromosome polymorphism in *Zygodontomys* (= *Bolomys*) *lasiurus* (Cricetidae, Rodentia) from Central Brazil. **Bras. J. Genet.**, v. 16, p. 225-235, 1993.

SWOFFORD, D. L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois, 1993.

THORPE, R. S.; CORTI, M. ; CAPANNA, E. Morphometric divergence of Robertsonian populations species of **Mus**: A multivariate analyses of size and shape. **Experientia**, v. 38, p. 920 –3, 1982.

TAYLOR, P.J. Patterns of chromosomal variation in southern African rodents. **J. Mammal.**, v. 81, p. 317-331, 2000.

TELENIUS, H.; PELMEAR, A.H.; TUNNACLIFFE, A.; et al. Cytogenetics analysis by chromossome painting using DOOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. **Genes, Chromosomes, Cancer.**, v. 4, p. 257-263, 1992.

VAUGHAN, T. A. **Mammalogy**. 2. Ed. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 522p., 1978.

VERMA, R.S.; BABU, A. **Human Chromosomes: Principles and Techniques**. 2a. ed., McGraw Hill Inc., p.419, 1995.

VIEIRA, A.; ORTIZ, M. I.; PINNA-SENN, E.; DALMASSO, G.; BELLA, J. L.; LISANTI, J. A. Chromosomal localization of telomeric sequences in three species of *Akodon* (Rodentia, Sigmodontinae). **Cytog. Genom. Res.**, v. 107, p. 99-102, 2004.

WATROUS, L. E.; WHEELER, Q. D. The outgroup comparison method of character analysis. **Syst. Zool.** , v. 30, p. 1-11, 1981.

WHITE, M. J. D. Models of speciation. **Science**, v. 159, p. 1065-70, 1968.

WHITE, M. J. D. Animals cytology and evolution. 3 ed. Cambridge, **Univ. Press**, p. 961, 1973.

WHITE, M. J. D. **Models of speciation**. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1978.

WIENBERG J.; STANYON R.; NASH W.G. et al. Conservation of human vs. feline genome organization revealed by reciprocal chromosome painting. **Cytogenet Cell Genet**, v. 77, p.211-217, 1997.

WIENBERG J.; STANYON R. Comparative chromosome painting of primate genomes. **ILAR Journal**, v. 39, p. 77-91, 1998.

WIENBERG, J. The evolution of eutherian chromosomes. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 14, p. 657-666, 2004.

WILSON, A. C. ; BUSH, G. L. : CASE, S. M. ; KING, M. C. Social structuring of Mammalian population and rate of chromosomal evolution. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 72, p. 5061-5, 1975.

WILSON, A. C.; SARICH, V. N.; MAXSON, L. R. The importance of gene rearrangement in evolution: evidence from studies on rates of chromosomal protein and anatomical evolution. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 71, p. 3028-3030, 1974.

WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference**. 2nd ed. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1992.

WOOD, A. E. A revised classification of the Rodents. **J. Mamm.**, v. 36, p. 165-187, 1955.

WOOD, A. E. Grades and clades among rodents. **Evolution**, v. 19, p. 115-130, 1965.

WURSTER, D.H. ; BENIRSCHKE, K. , 1970. Indian muntjac, *Muntiacus muntjak*: a deer with a low diploid chromosome number. **Science**, v. 168, p.1364 - 1366.

YANG, F.; O'BREIN, P. C. M.; FERGUSON-SMITH, M.A. Comparativ chromosome map of the laboratory mouse and Chinese hamster defined by reciprocal chromosome painting. **Chromosome Research**, v.8, p. 219-227, 2000.

YATES, T. L.; BAKER, R. J.; BARNETT, R. K. Phylogenetic analysis of karyological variation in three genera of peromyscine rodents. **Syst. Zool.**, v. 28, p. 40-8, 1979.

YONENAGA, Y. Chromosomal polymorphism in the rodent *Akodon arviculoides* ssp. ($2n = 14$) resulting from two pericentric inversions. **Cytogenetics**, v. 11, p. 488-499, 1972.

YONENAGA, Y. Karyotypes and chomosome polymorphism in Brazilian rodents. **Caryologia**, v. 28, p.269-86, 1975.

YONENEGA-YASSUDA, Y.; KASAHARA, S.; ALMEIDA, E.J.C. et al. Chromosomal banding patterns in *Akodon arviculoides* ($2n = 14$), *Akodon* sp. ($2n = 14$ and 25), and two male hybrids with 19 chromosomes. **Cytog. Cell Genet.**, v. 15, p. 388-399, 1979.

YONENAGA - YASSUDA, Y.; MAIA, V.; L'ABBATE, M. Two tanden fusions and supernumerary chromosomes in *Nectomys squamipes* (Cricetidae, Rodentia). **Caryologia**, v. 41, p. 25-39, 1988.

YOSIDA, T.H. Possible evidence for the karyotype evolution of the Indian spiny mouse due tanden fusion of the house mouse chromosomes. **Proc. Jpn. Acad.**, v. 55, p. 270-274, 1979.

YOUNG, B.D.; FERGUSON-SMITH, M.A.; SILLAR, R.; BOYD, E. High resolution analysis of human peripheral lymphocyte chromosomes by flow citometry. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 78, p. 7727-7731, 1981.

ZANCHIN, N. I. T. Estudos cromossômicos em orizominos e equimídeos da Mata Atlântica. Porto Alegre, tese, Mestrado, Departamento de Genética, UFRGS, 1988.

Anexo 1

A tabela apresenta todos os exemplares de Akodontinos, disponibilizados para o trabalho. Cada protocolo foi verificado quanto a qualidade das metáfases. Porém, após esta análise, observamos que 18 exemplares não estavam adequados devido a dessecação ou deterioração das metáfases. Estes problemas se deram principalmente pela grande demora de embarque do material (Brasil para a Alemanha), que apesar de ter sido bem acondicionado, não resistiu à espera nos aeroportos, pois se perdeu da refrigeração que acondicionava deste delicado material.

continua

PROT	TAXA	SE X	SIT	TOM	2n	LOCAL
P560**	<i>Akodon cursor</i>			GEN	14	
P702*		F	PC	GEN	14	I. Laranjeiras – PR
P703		F	PC	GEN	15	I. Laranjeiras – PR
P709		M	-	GEN	14	I. Rasa – PR
P712		M	PC	GEN	14	Ilha Rasa – PR
P716		F	P	GEN	15	I. Rasa – PR
P720		M	PC	GEN	14	I. Rasa – PR
P721		F	P	GEN	15	I. Rasa – PR
P722*		M	-	GEN	16	I. Rasa – PR
P723		F	P	GEN	15	I. Rasa – PR
P731		F	P	GEN	14	I. Rasa – PR
P732*		F	PC	GEN	15	Ilhas das Gamelas – PR
P733*		M	PC	GEN	14	I. Rasa – PR
P734		M	PC	GEN	15	I. Rasa – PR
P735		M	P	GEN	15	I. Rasa – PR
P736		F	P	GEN	14	Ilha das Gamelas – PR
P738*		M	P	GEN	15	I. Gamelas PR
P742		M	P	GEN	16	Guaraqueçaba (Massarapuã)
P744		F	P	GEN	15	Guaraqueçaba (Massarapuã)
P751		M	P	GEN	16	Guaraqueçaba (Massarapuã)
P762**			-	GEN	15	Guaraqueçaba (Massarapuã)
P765*		F	PC	GEN	16	Cria do Labor. Citog. Animal
P827*	<i>Akodon montensis</i>	M	PC	GEN	24	Quatro Barras – PR
P832**		M	PC	GEN	24	Quatro Barras – PR
P839		F	PC	GEN	24	Quatro Barras – PR
P840		M	PC	GEN	24	Piraquara – PR
P841		M	PC	GEN	24	Piraquara – PR
P842		M	PC	GEN	24	Cria Labor, mãe P592
P868		M	PC	GEN	24	Almirante Tamandaré – PR
P870**		F	-	GEN	25	PR
P871*		F	-	GEN	24	PR
P894**		F	-	GEN	24	Piraquara – PR
F725*		F	-	FURB	25	PN - Indaial – SC
P867	<i>Akodon paranaensis</i>		-	GEN	44	Reserva Cambuí – S. José dos Pinhais – PR
P875*		F	PC	GEN	44	Três Barras do Paraná – PR

P876**		M	C	GEN	44	Três Barras do Paraná – PR
P890*		M	PC	GEN	44	Curitiba – PR
P851*	<i>Akodon serrensis</i>	F	C	GEN	46	Quatro Barras – PR
P854*		F	PC	GEN	46	Piraquara – PR
P856*		M	PC	GEN	46	Piraquara – PR
F6559*	<i>Thaptomys nigrita</i>	M	-	FURB	52	PN – Blumenau – SC
F0995		F	-	FURB	52	PN – Indaial – SC
F5366		M	-	FURB	52	PN – Indaial – SC
F6715**		M	-	FURB	52	PN – Blumenau – SC
F5865		M	-	FURB	52	PN – Indaial – SC
P889*		F	PC	GEN	52	Cria Labor, Piraquara – PR
P892**		F	PC	GEN	52	Piraquara – PR
P893**		F	PC	GEN	52	Cria Labor, Piraquara – PR
P946		F	-	GEN	52	S. João do Triunfo – PR
P515**	<i>Necromys lasiurus</i>	F	-	MHCI	34	Jaguariaíva – PR
P519		M	-	MHCI	34	Jaguariaíva – PR
P521**		F	-	MHCI	34	Jaguariaíva – PR
P523**		M	-	MHCI	34	Jaguariaíva – PR
P524*		F	-	MHCI	34	Jaguariaíva – PR
P527**		F	-	MHCI	34	Jaguariaíva – PR
F6744**		F	-	FURB	34	São Domingos – SC
F6745**		F	-	FURB	34	São Domingos – SC
F6749*		M	-	FURB	34	São Domingos – SC
F6750*		F	-	FURB	34	São Domingos – SC
F6754		M	-	FURB	34	São Domingos – SC
F6756**		M	-	FURB	34	São Domingos – SC
P582	<i>Oxymycterus sp</i>	F	-	GEN	54	Curitiba – PR
P752**		M	P	GEN	54	Guaraqueçaba – PR
P754		F	P	GEN	54	Guaraqueçaba – PR
F696		F	-	FURB	54	Itá – SC
F795		M	-	FURB	54	Itá – SC
F6803*		F	-	FURB	54	São Domingos – SC
F6851*		M	-	FURB	54	São Domingos – SC
F5089*	<i>Brucepatersonius griserufescens</i>	M	-	FURB	52	Itá – SC
F6872*		F	-	FURB	52	PN – Esp. Indaial – SC

LEGENDA: SIT = presença de pele (P) e/ou crânio (C); F = FURB; TOM = Local de Tombamento; PATOB = Depto Patologia Básica; GEN = Depto Genética; MHCI = Museu de História do Capão da Imbuia; * espécies estudadas com FISH; **exemplares excluídos da amostra (material impróprio para análise).

Anexo 2 – Tabela de caracteres

Caracter	Cromossomo	Caracter	Cromossomo	Caracter	Cromossomo
1	1	47	15-3x	93	6/9
2	2	48	17-3x	94	6/10
3	3	49	18-3x	95	6/12
4	4	50	1-4x	96	6/14
5	5	51	10-4x	97	6/17
6	6	52	13-4x	98	7/10
7	7	53	14-4x	99	7/19
8	8	54	17-4x	100	8/13
9	9	55	1-5x	101	8/17
10	10	56	17-5x	102	9/10
11	11	57	17-7x	103	9/14
12	12	58	17-9x	104	10/16
13	13	59	1/3	105	10/17
14	14	60	1/5	106	11/12
15	15	61	1/6	107	11/15
16	16	62	1/8	108	11/16
17	17	63	1/9	109	11/17
18	18	64	1/10	110	12/17
19	19	65	1/11	111	13/15
20	X	66	1/13	112	14/15
21	1-2x	67	1/15	113	14/17
22	2-2x	68	1/16	114	15/16
23	3-2x	69	1/17	115	16/17
24	4-2x	70	2/5	116	17/18
25	5-2x	71	2/7	117	10/11-2x
26	6-2x	72	2/10	118	1/5/2
27	8-2x	73	2/13	119	2/7/18
28	9-2x	74	3/10	120	3/16/11
29	10-2x	75	3/12	121	3/18/5
30	11-2x	76	3/16	122	5/7/19
31	12-2x	77	3/18	123	6/9/14
32	13-2x	78	4/5	124	6/1/17
33	14-2x	79	4/8	125	6/17/14
34	15-2x	80	4/15	126	10/7/19
35	16-2x	81	4/16	127	10/11/12
36	17-2x	82	4/17	128	12/3/16
37	18-2x	83	4/18	129	13/8/17
38	1-3x	84	5/6	130	2/5/7/19
39	3-3x	85	5/7	131	6/10/14/7
40	5-3x	86	5/8	132	13/2/13/16
41	6-3x	87	5/10	133	4/5/8/5/4/16
42	8-3x	88	5/11	134	12/6/17/5/18/13
43	10-3x	89	5/12	135	12/17/10/9/1/3/1/10
44	11-3x	90	5/13	136	3/18/4/5/12/6/1/17/4/15/16/1/11
45	12-3x	91	5/17	137	13/16
46	13-3x	92	5/18		

[illegible]

